Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

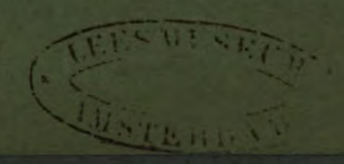
Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebenundsechzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.

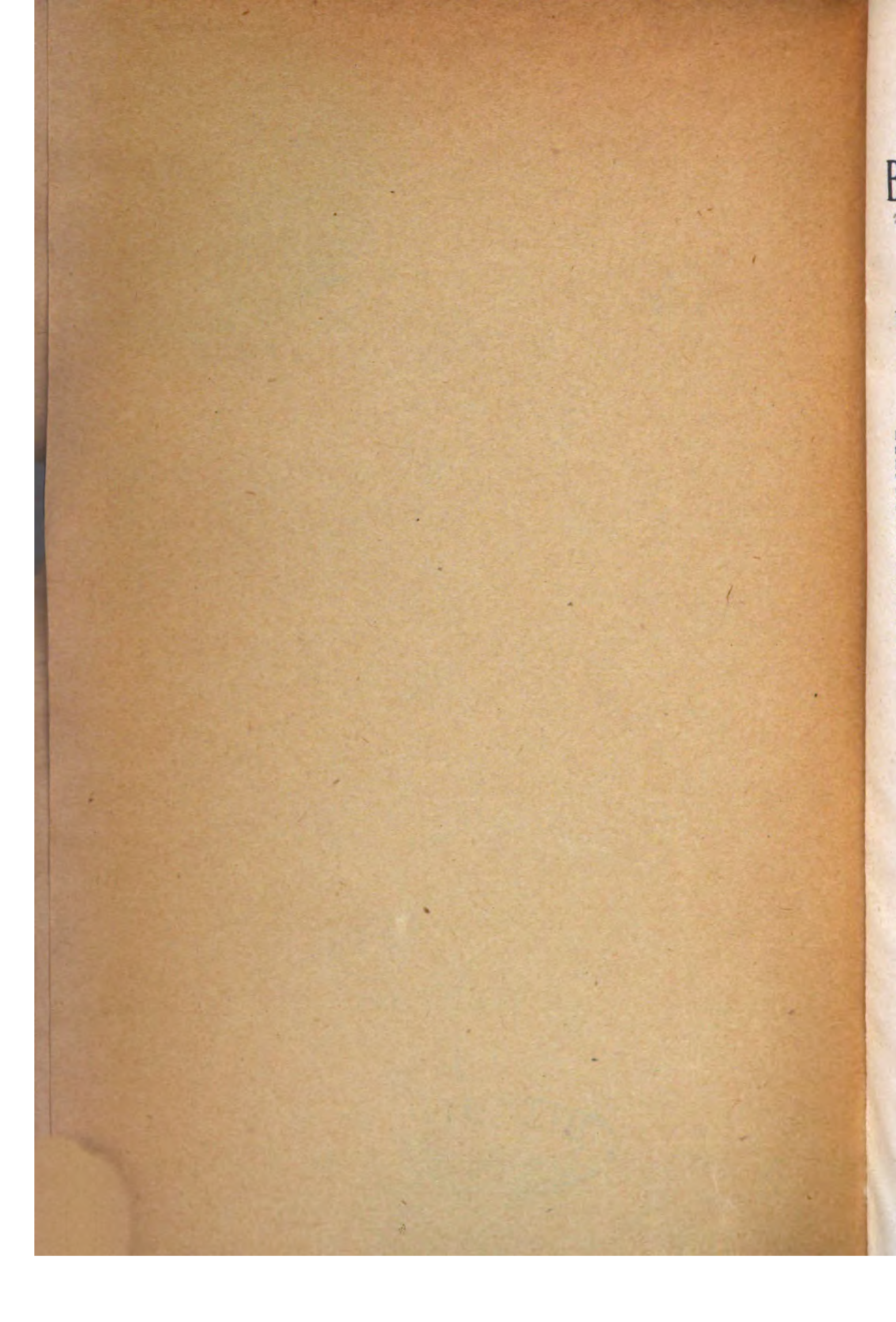





CHEMISTRY LIBRARY


F.G.KOSTER BOEKBINDER
AMSTERDAM


LEESMUSEUM
AMSTERDAM



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **F. Tangl**-Budapest, **A. von Wassermann**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **J. Bang**-Lund, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **W. Loeb**-Berlin, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Berlin, **L. Michaelis**-Berlin, **J. Morgenroth**-Berlin, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Rochmann**-Breslau, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **O. Warburg**-Berlin, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebenundsechzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig

Inhaltsverzeichnis.

Über das ungleiche Verhalten von Carboxylase und „Zymase" zu antiseptischen Mitteln.

Von

C. Neuberg und N. Iwanoff.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In der Wirkungsweise von Carboxylase und Zymase sind bisher schon einige Unterschiede bekannt geworden. In Säften aus Unterhefe, die beide Fermente gelöst enthalten, kann man durch physikalische Faktoren eine Zerstörung der Zymasewirkung herbeiführen, während die Carboxylase tätig bleibt. Erwärmung auf 50 bis 51° sowie Dialyse wirken in dieser Weise[1]). Bei Verwendung von frischen Hefen heben Chloroform und Toluol die Vergärung von Zucker auf, während Salze der Brenztraubensäure (Pyruvinate) noch zerlegt werden[1,2]). Bei Aufbewahrung von trockener Hefe[3]) und von Hefemacerationssaft[1]) verschwindet die Zymase viel früher als die Carboxylase, und neuerdings ist es uns gelungen, aus getrockneter Oberhefe einen Saft zu gewinnen, der nur Wirkungen der Carboxylase, aber nicht der Zymase aufweist[4]).

Eine systematische Untersuchung hat nun gelehrt, daß auf sehr einfache Weise neue Unterschiede in dem Verhalten beider Fermente aufgedeckt werden können.

Durch geeigneten Zusatz verschiedener Stoffe, die vielfach als Desinfektionsmittel Verwendung finden,

[1]) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 128 und 61, 171, 1913.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 76, 1911.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 56, 497, 1913.

[4]) C. Neuberg und L. Czapski, diese Zeitschr, 67, 9, 1914.

ist es leicht möglich, gärkräftigem Macerationssaft nach v. Lebedew vollständig seine Wirkung auf Rohrzucker oder Glucose zu nehmen, die Fähigkeit zur Vergärung von Brenztraubensäure aber zu erhalten.

Sowohl Antiseptica anorganischer als organischer Natur ließen sich ausfindig machen, die in diesem Sinne wirken, und zwar erkannten wir für den beabsichtigten Zweck als brauchbar: Natriumfluorid, Mercurichlorid, Formaldehyd, Phenol sowie Thymol.

Die Konzentration, in der die genannten Substanzen die Zuckervergärung aufheben, die Brenztraubensäuregärung aber im Gang belassen, ist jeweils recht verschieden und geht aus den unten mitgeteilten Versuchen und der Übersicht hervor.

Alle Substanzen kamen in reinster Form zur Anwendung, der Formaldehyd wurde durch vorangehendes Schütteln mit Calciumcarbonat und nachfolgender Destillation von beigemengter Ameisensäure befreit.

Die Antiseptica wurden dem Macerationssaft aus untergäriger Hefe teils in festem Zustand, teils in Lösung zugesetzt.

Die Gärsubstrate, Zucker und Brenztraubensäure, kamen der Vergleichbarkeit wegen jedesmal im selben Aggregatzustande zur Anwendung, das heißt: freie Brenztraubensäure wurde unverdünnt in Saft aufgelöst und entsprechend ebenso der Zucker; wo aber gelöstes Kaliumpyruvinat benutzt wurde, das in fester Form schwer erhältlich ist, wurde zum Vergleich auch eine Zuckerlösung angestellt.

Auf die Bereitung der Kaliumpyruvinatlösung verwendeten wir besondere Sorgfalt.

Die 2%ige Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 24,5 ccm n-Kalilauge wurde im Frigo auf — 10° abgekühlt, wobei sich ein dicker Eisklumpen abschied. Hierzu wurde die unterkühlte Lösung von 2,2 g Brenztraubensäure in 50 ccm Wasser gegeben, und nach dem Auftauen des Eises wurde die Lösung auf 110 ccm gebracht. Diese Lösung ist 2% in bezug auf Brenztraubensäure.

Der Ausfall der Versuche zeigt, daß die Empfindlichkeit der Carboxylase weit geringer als die der Zymase ist. Die Carboxylase weist in ihrem Verhalten zu

Giften eine ähnliche Resistenz auf, wie sie Bokorny[1]) für die einfach hydrolysierenden Fermente, z. B. Maltase, Invertase und Myrosin, in ausgedehnten Untersuchungen früher gefunden hat.

Die mitgeteilten Befunde besagen natürlich nichts über die Stellung der Carboxylase zur „Zymase“; denn wenn im System der letzteren die Carboxylase ein Glied bildet, so ist es möglich, daß zeitlich vor dem Eingreifen der Carboxylase ablaufende Reaktionsfolgen durch jene Zusätze gestört werden.

Jedenfalls gestattet die Benutzung der erwähnten Stoffe aus der Reihe der antiseptischen Mittel eine sehr einfache Demonstration der Carboxylasewirkung auch in Gegenwart von Zucker. Die Anwendung jener Zusätze ermöglicht das Studium der Carboxylasetätigkeit, ungestört von einem Eingreifen der „Zymase“.

Experimenteller Teil.

Vorbemerkungen.

a) Bei allen Versuchen konnte von der besonderen Zugabe eines bactericiden Mittels natürlich abgesehen werden; denn alle die benutzten Zusätze sind für sich kräftige Antiseptica.

b) Die Experimente, die größtenteils mehrfach wiederholt und im Ergebnis übereinstimmend befunden wurden, kontrollieren sich insofern von selbst, als jedem positiven Carboxylaseversuch stets ein ganz entsprechender, negativ ausgefallener „Zymase“-Versuch gegenübersteht; auch dadurch ist irgendeine Täuschung durch mangelhafte Sterilität ausgeschlossen.

c) Die Gärungsgemische wurden stets in Schröttersche Gärröhrchen gefüllt, deren lange Schenkel 10 ccm Kapazität besaßen. Da nur Vergleiche angestrebt wurden, ist die Genauigkeit ausreichend. Die Verwendung von Eudiometern hätte die Ansammlung von mehr Gas erlaubt, wäre aber umständlicher gewesen. Bei dem völligen Fehlen der Zymasetätigkeit sind also die Ausschläge für die Carboxylase noch höher anzusetzen.

---

[1]) Th. Bokorny, Arch. f. d. ges. Physiol. 85, 257, 1901; **108**, 216, 1905; **111**, 348, 1906.

I. Versuche mit Natriumfluorid.

1a. 15 ccm Lebedew-Saft wurden mit 0,15 g festem NaF und 0,5 g Rohrzucker in Substanz versetzt. Es erfolgte opake Trübung. Das im Gärrohr im Brutschrank aufbewahrte Gemisch zeigte nach 18 Stunden keine Spur Gärung.

1b. 15 ccm Saft wurden mit 0,15 g festem NaF versetzt und 2 Tropfen krystallisierbarer Brenztraubensäure hinzugegeben. Es erfolgte partielle Koagulation, aber trotzdem trat starke Gärung ein. Nach 18 Stunden hatten sich 3 ccm Kohlensäure angesammelt.

1c. Selbst mit dem doppelten Quantum NaF, d. h. mit 0,3 g reinem NaF, auf 15 ccm Saft plus 2 Tropfen Brenztraubensäure trat noch Gärung ein. Die Koagulation war sehr stark, doch war nach 18 Stunden 1 ccm CO_2 angesammelt[1]).

2a. 7 ccm Saft plus 7 ccm 2%ige Glucoselösung plus 0,14 g festem NaF. Partielle Koagulation, aber selbst nach 18 Stunden keine Spur Gasentwicklung.

2b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2%ige Kaliumpyruvinatlösung plus 0,14 g NaF (fest). Zunächst erfolgt Trübung und bald setzt Gärung ein. Nach 18 Stunden hatten sich aus der stark koagulierten Masse 3 ccm Gas entwickelt; die Reaktion des Gärguts war alkalisch.

3a. 13 ccm Saft wurden mit 4 ccm 5%iger Fluornatriumlösung versetzt und 0,5 g fester Rohrzucker hinzugegeben. Die Lösung blieb nahezu klar, entwickelte aber innerhalb 20 Stunden keine Spur Gas.

3b. 13 ccm Saft, 4 ccm 5%ige Fluornatriumlösung plus 2 Tropfen reiner Brenztraubensäure. Es tritt partielle Koagulation ein, aber schon nach 1 Minute ist eine stürmische Gärung im Gange. Nach 5 Minuten haben sich schon 4 ccm Kohlendioxyd angesammelt, nach 20 Minuten 5 ccm.

4a. 7 ccm Saft plus 7 ccm 2%ige Traubenzuckerlösung plus 0,2 g gepulvertes NaF. Die Mischung bleibt hell, zeigt aber nach 20 Stunden keine Spur einer Gärung.

4b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2%ige Kaliumpyruvinatlösung plus 0,2 g festes NaF. Nach 1 Minute Beginn der

---

[1]) Das Gas entstammt keiner Selbstgärung des Saftes, wie die Kontrolle mit Zucker (Versuch 1a und alle folgenden) lehren.

Gasentwicklung. Nach 20 Stunden haben sich 2 ccm Kohlendioxyd angesammelt. Das Gemisch reagiert jedoch stark alkalisch und hält demgemäß CO_2 in Lösung. Auf Zugabe von Salzsäure verdoppelt sich die Menge des Kohlensäuregases.

Es sei daran erinnert, daß für ein anderes Salz der Flußsäure, Ammoniumfluorid, die Giftwirkung auf Hefepreßsaft schon von Buchner (Zymasegärung S. 184) angegeben ist. Offenbar verhalten sich in dieser Hinsicht Macerations- und Preßsaft gleich.

II. Versuche mit Sublimat.

1a. 7 ccm Saft plus 7 ccm Wasser plus 0,5 g festem Rohrzucker plus 0,5 ccm 2%ige $HgCl_2$-Lösung. Es erfolgt keine Koagulation, aber innerhalb 18 Stunden keinerlei Gärung.

1b. 7 ccm Saft plus 7 ccm 2%ige Kaliumpyruvinatlösung plus 0,5 ccm 2%ige $HgCl_2$-Lösung. Nach 18 Stunden Koagulation und 3 ccm Gas. Die Lösung reagiert stark alkalisch und entbindet auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure im ganzen 7 ccm Kohlendioxyd.

2a. 14 ccm Saft, 0,5 g Rohrzucker (fest) plus 0,5 ccm 2%ige $HgCl_2$-Lösung. Das Gemisch bleibt nahezu klar; nach 20 Stunden keine Spur Gärung.

2b. 14 ccm Saft, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure, 0,5 ccm 2%ige $HgCl_2$-Lösung. Nach 1 Minute Gärung im Gange, partielle Koagulation; nach 20 Stunden 6 ccm CO_2.

III. Versuche mit Formaldehyd.

A. Mit 35%igem käuflichem Formaldehyd.

1a. 15 ccm Saft, 0,3 ccm 35%iges Formalin, 0,5 g fester Rohrzucker. Anfangs schwache und nach 18 Stunden starke Koagulation. Keine Spur CO_2.

1b. 15 ccm Saft, 0,3 ccm 35%iges Formalin, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure. Glatte Gärung. Partielle Koagulation. Nach 2 Stunden 12 ccm CO_2.

1c. 15 ccm Saft, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure, 0,5 ccm 35%iges Formalin. Stärkere Koagulation. Nur nach 18stündigem Stehenlassen Blasen in dem erstarrten Magma[1]).

[1]) Der Inhalt des Gärrohrs ist zu einem Gel erstarrt, das auch beim Umkehren des Gefäßes nicht ausfließt. Wenn eine Gärung stattgefunden hat, ist namentlich in der geronnenen Säule des langen Schenkels eine Durchsetzung mit Gasperlen wahrnehmbar.

1d. Dasselbe mit 1 ccm 35 %igem Formaldehyd. Starke Koagulation. Keine Gasentwicklung mehr wahrnehmbar.

1e. 15 ccm Saft, 0,1 ccm 35 %iger Formaldehyd, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure. Keine Koagulation. Alsbald völlige Ausgärung.

2a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige K-Pyruvinatlösung, 0,3 ccm 35 %iger Formaldehyd. Gärt nach 1 Minute. Keine Koagulation. Nach 18 Stunden 6 ccm CO_2.

2b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Glucoselösung, 0,3 ccm 35 %iger Formaldehyd. Gärt nicht. Trübung. Nach 18 Stunden keine Spur CO_2.

2c. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige K-Pyruvinatlösung, 0,5 ccm 35 %iger Formaldehyd. Trübung. Gärt schnell. Nach 3 Stunden 4 ccm CO_2, nach 18 Stunden 6 ccm CO_2. Schwach alkalische Reaktion.

2a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige K-Pyruvinatlösung, 1,0 ccm 35 %ige Formaldehydlösung. Trübung. Nach 18 Stunden 1 ccm CO_2.

B. Mit gereinigtem Formaldehyd, der jetzt 30 %ig war.

1a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Glucoselösung, 0,3 ccm gereinigter Formaldehyd. Trübung. Nach 20 Stunden keine Gärung.

1b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige K-Pyruvinatlösung, 0,3 ccm gereinigter Formaldehyd. Gärt nach 1 Minute. Keine Koagulation. Nach 20 Stunden 5 ccm CO_2. Schwach alkalische Reaktion.

1c. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige K-Pyruvinatlösung. 0,5 ccm gereinigter Formaldehyd. Gärt schnell. Nach 20 Stunden 5 ccm CO_2. Keine Koagulation, schwach alkalische Reaktion.

2a. 14 ccm Saft, 2 Tropfen Brenztraubensäure (rein), 0,3 ccm gereinigter Formaldehyd. Partielle Koagulation. Nach 1 Minuten stürmische Gärung, nach 10 Minuten 6 ccm CO_2, nach 20 Stunden 8 ccm CO_2.

2b. 14 ccm Saft, 2 Tropfen krystallisierbare Brenztraubensäure, 1,0 ccm gereinigter Formaldehyd. Es erfolgt starke Koagulation. Nach 20 Stunden ist keine Gärung wahrnehmbar.

Wie man sieht, ist der Unterschied in der Wirkung von käuflichem und gereinigtem Formaldehyd nicht groß.

IV. Versuche mit Phenol.

1a. 15 ccm Macerationssaft, 0,5 g fester Rohrzucker, 0,15 g geschmolzenes Phenol[1]). Starke Koagulation. Nach 24 Stunden im Brutschrank keine Anzeichen einer Vergärung.

1b. 15 ccm Saft, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure, 0,15 g geschmolzenes Phenol. Kräftige Koagulation. Nach 24stündiger Aufbewahrung im Brutschrank starke Durchsetzung des Magmas mit Blasen von CO_2, die nicht durch die erstarrte Schicht aufsteigen konnten.

2a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Phenollösung, 0,5 g fester Rohrzucker. Nach 18 Stunden koagulierte Masse, ohne Spuren von CO_2.

2b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Phenollösung, 2 Tropfen reine Brenztraubensäure. Nach 18 Stunden reichliche Durchtränkung der erstarrten Säule mit zahlreichen CO_2-Blasen.

V. Versuche mit Thymol.

1a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Traubenzuckerlösung, 0,3 ccm 5 %ige Thymollösung[2]). Koagulation, keine Gärung nach 18 Stunden.

1b. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Pyruvinatlösung, 0,3 ccm 5 %ige Thymollösung. Starke Koagulation. Nach 18 Stunden 3 ccm CO_2.

2a. 7 ccm Saft, 7 ccm 2 %ige Glucoselösung, 0,6 ccm 5 %ige Thymollösung. Koagulation. Nach 4 Stunden keine Gärung.

2b. 7 ccm Saft, 7 ccm Kaliumpyruvinatlösung, 0,6 ccm 5 %ige Thymollösung. Gärt alsbald, nach 4 Stunden 2 ccm CO_2, stark alkalische Reaktion. Nach Hinzufügen von HCl werden 6 ccm gasförmige Kohlensäure frei.

In allen Fällen haben wir uns davon überzeugt, daß sämtliche Proben des verwendeten Macerationssaftes ohne Zusatz eines

---

[1]) Für Hefepreßsaft hat F. Duchacek (diese Zeitschr. 18, 211, 1909) gezeigt, daß eine 1,2 %ige Konzentration an Phenol die Gärkraft aufhebt.

[2]) Erhalten durch Auflösen von 5,0 g Thymol in 100 ccm gewöhnlichem Alkohol.

der genannten Giftstoffe zugegebenen festen Rohrzucker oder Traubenzucker bzw. Brenztraubensäure lebhaft vergoren; das gleiche war der Fall, wenn sie mit demselben Quantum 2 %iger Saccharose- oder Glucoselösung bzw. mit 2 %iger Kaliumpyruvinatlösung gemischt wurden.

Wir wollen noch erwähnen, daß wir unter anderem auch den Einfluß von Calciumchlorid und von Kaliumcyanid untersucht haben. Nach Buchner (Zymasegärung, S. 168) ist Calciumchlorid ein starkes Gift für die Zymase und hindert demgemäß die Gärung durch Preßsaft. In Konzentrationen, wo bei unserem Macerationssaft diese Schädigung der Zymase auftrat — 0,5 g $CaCl_2$ auf 14 ccm Saft —, haben wir auch ein Aufhören der Carboxylasewirkung konstatieren müssen. Bei Zugabe von 0,2 g $CaCl_2$ auf 14 ccm Macerationssaft gärten sowohl Zucker als Brenztraubensäure. In Gegenwart von Cyankalium (0,3 ccm 1 %ige KCN-Lösung auf 14 ccm Saft, bzw. auf 7 ccm Saft plus 7 ccm 2 %ige Zuckerlösung) vergor die Brenztraubensäure deutlich schwächer als Zucker. Der Grund liegt offenbar in der chemischen Umsetzung zwischen Brenztraubensäure und Cyanid (Cyanhydrinreaktion).

Es kann kaum zweifelhaft sein, daß man noch durch andere mineralische oder organische Zusätze Carboxylase und „Zymase“ wird unterscheiden können. Auch dürften die genannten Stoffe noch bei anderen relativen Verhältnissen von Saft, Substrat, Wasser und Antisepticum dazu befähigt sein.

Die von uns als wirksam befundenen Verhältnisse geben wir tabellarisch in folgender Übersicht wieder:

Die Wirkung der „Zymase“ wird aufgehoben, die von Carboxylase bleibt erhalten

bei Zusatz von rund	
1 g NaF	zu 100 ccm unverdünntem Saft + reinem Substrat,
2 g NaF	„ 50 „ Saft und 50 ccm wässeriger Substratlösung,
30 ccm 5 %ige NaF-Lösung	„ 100 „ unverdünntem Saft + reinem Substrat,
3,5 „ 2 % „ $HgCl_2$- „	„ 100 „ unverdünntem Saft + reinem Substrat,
3,5 „ 2 % „ $HgCl_2$- „	„ 50 „ Saft und 50 ccm wässeriger Substratlösung,
2,0 „ 30 % „ Formaldehyd-Lösung	„ 100 „ unverdünntem Saft + reinem Substrat,
2,0 „ 30 % „ Formaldehyd- „	„ 50 „ Saft und 50 ccm wässeriger Substratlösung,
50,0 „ 2 % „ Phenol-Lösung	„ 50 „ unverdünntem Saft + reinem Substrat,
2,0 „ 5 % „ Thymol- „	„ 50 „ Saft und 50 ccm wässeriger Substratlösung.

Über Carboxylase im Saft aus obergäriger Hefe.

Von

C. Neuberg und L. Czapski.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Durch die Untersuchungen von Neuberg und seinen Mitarbeitern über die zuckerfreien Hefegärungen ist gezeigt worden, daß ober- und untergärige Hefen Brenztraubensäure und analog konstituierte Ketosäuren zerlegen. Die Spaltung in Kohlendioxyd und den entsprechenden Aldehyd erfolgt durch ein besonderes Ferment, die Carboxylase. Insbesondere für die Brenztraubensäure hat sich herausgestellt, daß alle zuckervergärenden lebenden Hefen der verschiedensten Rassen auch die Brenztraubensäure vergären.

Gärwirksamer Hefepreßsaft sowie Hefemacerationssaft aus Unterhefe enthalten reichlich Carboxylase. Nun ist es nach E. Buchner[1]) nur selten möglich, aus deutschen Oberhefen einen gärkräftigen Preßsaft zu gewinnen, und auch v. Lebedew[2]) gibt an, daß er aus französischer obergäriger Hefe nach seiner Methode stets nur inaktive Säfte erhalten konnte.

Aus den Arbeiten von Neuberg mit Karczag und Rosenthal (1910 bis 1914) geht nun hervor, daß Brenztraubensäure von frischen Hefen und Hefepräparaten noch unter Bedingungen vergoren wird, unter denen Zucker nicht angegriffen wird. Daher war zu versuchen, ob der Macerationssaft aus Oberhefe nicht wenigstens Brenztraubensäure zu zerlegen imstande sei.

---

[1]) Buchner-Hahn, Zymasegärung, S. 57.

[2]) A. v. Lebedew, Annales de l'Inst. Pasteur 26, 21, 1912.

In der Tat ist es uns gelungen, unter den im folgenden angegebenen Verhältnissen aus Oberhefe einen Saft zu gewinnen, der wirksame Carboxylase enthält.

Als Ausgangsmaterial diente das Florylin[1]), ein Hefentrockenpräparat, das nach Angabe der fabrizierenden Firma durch Trocknung von obergäriger Brennereihefe gewonnen wird. Das Florylin kommt in kleinen Stäbchen in den Handel und zeigt nach der vorschriftsmäßigen Aufweichung in Wasser eine ausgezeichnete Gärkraft. Zur Herstellung eines carboxylasehaltigen Macerationssaftes ist das käufliche Produkt nicht ohne weiteres geeignet; obgleich es ein trockenes Material darstellt, ist die Wasserentziehung offenbar nicht ausreichend, um bei erneutem Zusammenbringen mit Wasser einen Austritt der Carboxylase zu ermöglichen.

Wir gelangten jedoch zum Ziele, als wir das lufttrockene Florylin einer nochmaligen Wasserentziehung durch 8stündige Erwärmung im Luftstrom des Faust-Haimschen Apparates unterwarfen. Die resultierende Masse, die noch die ursprüngliche Stäbchenform hatte, wurde alsdann im Mörser verrieben und in die 3fache Menge Wasser von 40^0 eingerührt. Das Gemisch blieb alsdann verschieden lange im Brutschrank, zwischen 2 und 4 Stunden. Die 4stündige Digestion ergab die besten Resultate.

Durch Filtration im Eisschrank gewinnt man dann den Macerationssaft, der erheblich heller als solcher aus Unterhefe aber opaker ist. Der so erhaltene Saft gerät auf Zusatz von festem Zucker (1 bis $15^0/_0$) bei Gegenwart von Toluol nicht in Gärung, dagegen zerlegt er zugesetzte Brenztraubensäure mit und ohne Zugabe von Toluol. Die Brenztraubensäure wurde in reinem Zustande bis zu $1^0/_0$ oder in einer der Saftmenge gleichen Quantität $1^0/_0$iger Pyruvinatlösung zugefügt. Als Antisepticum können Toluol oder Chloroform verwendet werden.

Die Wirkung der Carboxylase setzt rasch ein, aber der Verlauf ist weder so stürmisch noch so intensiv wie bei Saft aus Unterhefe. Das beste Resultat ergab die Vergärung eines

[1]) Wir sind der Florylingesellschaft für Überlassung eines Teiles des Materials für unsere Versuche zu besonderem Dank verpflichtet.

Gemisches von Obersaft und 1 $^0/_0$iger Lösung von brenztraubensaurem Kalium (7 zu 7 ccm), die nach 16 Stunden im Brutschrank 2 ccm Kohlensäure lieferte, während ein beträchtlicher Teil (6 ccm) noch auf Salzsäurezusatz aus dem entstandenen Bicarbonat frei wurde.

Selbstgärung haben wir in 6 verschiedenen Saftproben niemals beobachtet, was ja mit dem Fehlen der Zymase im besten Einklange steht.

Im übrigen zeigt der Saft aus Oberhefe ähnliche Eigenschaften wie der aus Unterhefe: beim Erwärmen erfolgt Trübung und in der Hitze Koagulation, jedoch ist der Eiweißgehalt geringer als bei Untersaft. Säuren, auch die Brenztraubensäure, ergeben je nach der Menge mehr oder minder starke Ausflockungen.

Folgende Daten haben wir für den Saft ermittelt:

Trockensubstanz: 7,48 bis 9,02 $^0/_0$.

In der Siedehitze koagulables Eiweiß: 1,10 bis 1,73 $^0/_0$.

Gesamt-Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl): 0,61 bis 1,11 $^0/_0$.

Spez. Gew. (17°): 1,029.

Schließlich wurde das Verhalten der Carboxylase des Obersaftes auch gegen eine andere Ketosäure, die Oxalessigsäure, geprüft. Eine 1 $^0/_0$ige Lösung derselben (7 ccm) gerät auf Zusatz der gleichen Menge Obersaft bei Zimmertemperatur unter Zusatz von Toluol nach wenigen Augenblicken in Gärung. Nach 1 Stunde haben sich bereits 2 ccm Gas angesammelt, und nach 24 Stunden ist diese Menge auf 8 ccm gestiegen. Die Kontrolle mit 0,5 $^0/_0$iger rein wässeriger Oxalessigsäure ohne Zusatz von Saft hatte bei Zimmertemperatur in 24 Stunden nur eine Gasblase entwickelt (die Oxalessigsäure gibt bekanntlich beim Erwärmen Kohlensäure ab).

Der Gehalt des Obersaftes an Carboxylase ist damit bewiesen; die Gärkraft desselben ist jedoch geringer als beim Untersaft.

Über die Gärwirkung frischer Hefen bei Gegenwart von Antisepticis.

Von

C. Neuberg und F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Im allgemeinen wird angenommen, daß ein Zusatz von Toluol oder Chloroform zu frischer Hefe deren Einwirkung auf Monosaccharide aufhebt, d. h. eine Vergärung des Zuckers unterbricht. Nur die „Zymase" der frischen Hefe wird von dieser Art von Antiseptica in ihrer Tätigkeit behindert, während die einfach hydrolysierend wirkenden Hefenenzyme, wie Invertase und Maltase, auch bei Gegenwart von Toluol und Chloroform ihre Wirkung äußern. Dabei wirkt die Invertase noch nach zwei Jahren[1]). Und jetzt hat es sich herausgestellt, daß auch die Carboxylase[2]) bei Verwendung von frischen Hefen in Gegenwart von Antisepticis auf brenztraubensaure Salze ihre Wirkung entfaltet. Gerade bei den letztgenannten Untersuchungen sind wir darauf aufmerksam geworden, daß Chloroform und Toluol keineswegs gleichartig wirken und daß insbesondere das relative Mengenverhältnis zwischen Hefe, Antisepticum und Wasser, sowie namentlich Ernährungszustand und Rasseneigentümlichkeiten der Hefen für den Ausfall der Versuche von Bedeutung sind[3]).

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **56**, 495, 1913. Eine am 9. Juni 1914 vorgenommene Prüfung ergab, daß die am 3. Juni 1912 angestellte antiseptische Hefenaufschwemmung noch höchst wirksames Invertin enthielt.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 76, 1911. — C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. **51**, 128, 1913; **61**, 171, 1914.

[3]) Vgl. die Protokolle bei Neuberg und Rosenthal, diese Zeitschr. **51**, 130 und 131, 1913.

Wir haben keine Untersuchungen in der Literatur gefunden, die den hier in Betracht kommenden Teil dieser einfachen Frage erschöpfen oder auch nur die bestehende Unsicherheit erkennen lassen. Dieses Verhältnis ist um so auffallender, als sehr wichtige Schlüsse über den Mechanismus der Gärung mit diesen Fragen verquickt worden sind. Wir erinnern einerseits an Rubner[1]), der jüngst eine Trennung des Gärungsaktes in eine rein fermentative Zerlegung des Zuckers durch die Zymase und eine Zuckerzerstörung durch die vitalen Wirkungen des lebenden Protoplasmas vornimmt.

Der erste der zwei genannten Vorgänge soll durch frische Hefe in Gegenwart von Toluol zum Ausdruck kommen, während beide zusammen sich bei Anwendung der frischen Hefe ohne Antisepticum offenbaren sollen. Wir erwähnen weiter die Diskussion von Neuberg und Kerb[2]) mit Kostytschew, wo die beiden erstgenannten auf die Bedeutung dieses Verhaltens bei der Autolyse der Hefe hingewiesen und gezeigt haben, daß man durch ihre Nichtbeachtung zu falschen Urteilen über das Wesen der Selbstgärung kommen muß.

Wir teilen nun unsere Erfahrungen über den Einfluß von Chloroform und Toluol auf die Gärung in solchen Ansätzen mit, wie sie für experimentelle Studien vielfach gemacht werden.

Durch polarimetrische und titrimetrische Ermittelungen des Traubenzuckers zu Beginn der Versuche sowie nach bestimmten Inkubationszeiten kommt man leicht zu einem Einblick in die obwaltenden Verhältnisse.

Im Einklang mit unseren früheren Beobachtungen finden wir, daß die gärungsaufhebende Kraft des Toluols weit unsicherer ist als die des Chloroforms. Letzteres kann mit Sicherheit den Eintritt jeder Vergärung verhindern, und man konstatiert dann bei Anwendung von an Polysacchariden reicher Hefe eine Zunahme von Traubenzucker, der gemäß den Erfahrungen von E. Salkowski[3]) durch autolytische Hydrolyse von zuckerartigen Hefebestandteilen entstanden ist.

[1]) M. Rubner, Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung. Leipzig 1913.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 58, 163, 1913; 64, 254, 1914.

[3]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 506, 1889.

Wir können hinzufügen, daß kleine Mengen Toluol (Verhältnis von 1 oder 2:100), wie sie vielfach zur Verhinderung von Bakterienwachstum angewendet werden, die Gärung durch Hefe keineswegs aufheben, namentlich nicht bei einer gärkräftigen Sorte wie Hefe XII.

Experimenteller Teil.

Im allgemeinen wurde wie folgt verfahren:

Eine Lösung von 60 g ganz reinem Traubenzucker in 900 ccm Wasser wurde in 3 gleiche Teile geteilt. Jede Portion wurde mit 20 ccm Toluol oder mit je 10 ccm Toluol und 10 ccm Chloroform und mit je 60 g Hefe versetzt. Die eine der fest verschlossenen und kräftig durchgeschüttelten Flaschen wurde dann gleich in den Brutschrank gestellt, die zweite bei Zimmertemperatur stehen gelassen und der Inhalt der dritten sofort zur Bestimmung der Anfangskonstanten verwendet.

Zu diesem Zwecke wurden jeweils genau 50,0 ccm nach Michaelis und Rona mit 10,0 ccm kolloidalem Eisen enteiweißt und nach einigen Minuten, während denen kräftig durchgeschüttelt wurde, filtriert.

Die polarimetrische Zuckerbestimmung geschah im 1-dcm-Rohr bei weißem Licht in einem Apparat, der die direkte Ablesung der Traubenzuckerprozente bei Verwendung von 20-cm-Rohren gestattete. Die abgelesenen Zahlen sind demgemäß verdoppelt.

Zur titrimetrischen Bestimmung des Zuckergehalts nach Pavy-Kumagawa-Suto-Kinoshita[1]) wurden jeweils 5,0 ccm im Meßkölbchen auf 100 ccm verdünnt und titriert.

Vorhandenes Chloroform war vor der Auffüllung durch Erwärmen ausgetrieben; denn wegen seines Reduktionsvermögens hätte es Fehler bei der Titration bedingen können.

Auszug aus den Protokollen.

1. Versuche nur in Gegenwart von Toluol.

a) Gäransatz: Lösung von 20 g Traubenzucker in 300 ccm Leitungswasser in Gegenwart von 20 ccm Toluol mit 60 g ab gepreßter Hefe M. Das Volumen nimmt beträchtlich zu.

[1]) Diese Zeitschr. 9, 219, 1908.

Anfangspolarisation: (im 1-dcm-Rohr + 2,25°) = 4,5 % Zucker.
Anfangstitration: 4,40 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titratio
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
4,2 % Zucker	4,00 % Zucker	4,0 % Zucker	3,84 % Zucker
nach 48 Stunden			
4,0 % Zucker	3,84 % Zucker	4,0 % Zucker	3,78 % Zucker
nach 72 Stunden			
3,9 % Zucker	3,63 % Zucker	4,0 % Zucker	3,84 % Zucker

b) **Gäransatz:** Mit Hefe K ganz wie unter a).
Anfangspolarisation: 4,9 % Zucker.
Anfangstitration: 4,76 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
3,4 % Zucker	3,31 % Zucker	4,0 % Zucker	3,85 % Zucker
nach 48 Stunden			
3,2 % Zucker	3,00 % Zucker	4,1 % Zucker	3,72 % Zucker
nach 72 Stunden			
3,1 % Zucker	2,80 % Zucker	4,0 % Zucker	3,67 % Zucker

c) **Gäransatz:** Mit Hefe XII wie unter b).
Anfangspolarisation: 4,3 % Zucker.
Anfangstitration: 4,54 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
3,9 % Zucker	3,52 % Zucker	2,9 % Zucker	2,53 % Zucker
nach 48 Stunden			
4,0 % Zucker	3,57 % Zucker	2,2 % Zucker	2,04 % Zucker
nach 96 Stunden			
3,9 % Zucker	3,60 % Zucker	2,3 % Zucker	2,00 % Zucker

2. Versuche in Gegenwart von Toluol und Chloroform.

a) **Gäransatz:** Lösung von 65 g Traubenzucker in 1250 ccm Leitungswasser in Gegenwart von 45 ccm Toluol und 45 ccm Chloroform mit 250 g Hefe M.

Anfangspolarisation: 3,1 % Zucker.
Anfangstitration: 2,72 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 48 Stunden			
3,0 % Zucker	2,63 % Zucker	3,0 % Zucker	2,83 % Zucker
nach 72 Stunden			
2,8 % Zucker	2,53 % Zucker	2,7 % Zucker	2,66 % Zucker

b) Gäransatz: Lösung von 32 g Traubenzucker in 625 ccm Leitungswasser in Gegenwart von 15 ccm Toluol und 15 ccm Chloroform mit 125 g Hefe XII.

Anfangspolarisation: 3,4 % Zucker.
Anfangstitration: 3,03 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
3,0 % Zucker	2,70 % Zucker	3,2 % Zucker	3,03 % Zucker

c) Gäransatz: Mit Hefe K, sonst wie unter 2 b).

Anfangspolarisation: 3,1 % Zucker.
Anfangstitration: 2,85 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
3,1 % Zucker	2,74 % Zucker	2,9 % Zucker	2,85 % Zucker

d) Gäransatz: Lösung von 60 g Traubenzucker in 900 ccm Leitungswasser in Gegenwart von 30 ccm Toluol und 30 ccm Chloroform mit 180 g Hefe M.

Anfangspolarisation: 4,5 % Zucker.
Anfangstitration: 4,44 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
4,3 % Zucker	4,34 % Zucker	4,2 % Zucker	4,04 % Zucker
nach 48 Stunden			
4,4 % Zucker	4,15 % Zucker	4,1 % Zucker	4,25 % Zucker
nach 72 Stunden			
4,54 % Zucker	4,25 % Zucker	4,2 % Zucker	4,16 % Zucker

3. Versuch in Gegenwart von Chloroform.

Gäransatz: Lösung von 60 g Traubenzucker in 900 ccm Leitungswasser in Gegenwart von 90 ccm Chloroform mit 180 g Hefe K.

Anfangspolarisation: 4,5 % Zucker.
Anfangstitration: 4,54 % Zucker.

Polarisation	Titration	Polarisation	Titration
Bei Zimmertemperatur		Im Brutschrank	
nach 24 Stunden			
4,4 % Zucker	4,54 % Zucker	4,5 % Zucker	4,87 % Zucker
nach 48 Stunden			
4,5 % Zucker	4,51 % Zucker	4,3 % Zucker	4,65 % Zucker
nach 72 Stunden			
4,5 % Zucker	4,54 % Zucker	4,2 % Zucker	4,59 % Zucker

Die mitgeteilten Werte zeigen eine befriedigende Übereinstimmung zwischen den polarimetrisch und titrimetrisch ermittelten Daten. Eine völlige Kongruenz ist nicht zu erwarten, da im Verlaufe der Digestion optisch-aktive Substanzen aus den Hefen in Lösung gehen, die bezüglich Drehung und Reduktionskraft verschiedene Werte besitzen und ungleichen Umwandlungen unterliegen.

In den mit Toluol versetzten Flaschen war bisweilen nach 24 Stunden ein deutlicher Druck zu konstatieren. Hier muß man eine wirkliche Vergärung von Zucker annehmen.

Bei den Versuchen mit hinreichend Chloroform oder Chloroform-Toluol-Gemisch war diese Erscheinung nicht zu beobachten, und auch die Ergebnisse der Bestimmungen zu Anfang sowie nach 24, 48 und 72 Stunden zeigen, daß hier tatsächlich der Gärakt unterdrückt ist. Man muß daraus schließen, daß im Sinne von O. Warburg[1]) Chloroform sicherer oder stärker von den Hefen gebunden und an den Reaktionsorten der Hefezellen zu wirksamerer Konzentration angereichert wird.

[1]) O. Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465, 1912 und A. Dorner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 99, 1912.

Phytochemische Reduktionen. V.

Zwischenstufen bei der Umwandlung der Nitrogruppe in die Aminogruppe.

Von

C. Neuberg und E. Welde.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In unserer ersten Mitteilung[1]) über diesen Gegenstand haben wir dargelegt, in welcher Weise phytochemische Untersuchungen geeignet sind, zur Aufklärung der noch völlig rätselhaften Nitratassimilation der Pflanze beizutragen.

Die einfachste Annahme ist gewiß die, daß die Salpetersäure der anorganischen Nitrate mit kohlenstoffhaltigem Material unter Bildung von organischen Nitrokörpern reagiert und daß diese dann eine Umwandlung zu den uns überall entgegentretenden Aminokörpern erfahren.

Wir haben zeigen können, daß dieser Übergang der Nitro- zur Aminogruppe sowohl in der aromatischen wie in der aliphatischen Reihe experimentell bewerkstelligt werden kann, wenn man geeignete pflanzliche Objekte wählt; als solche dienten uns verschiedene Rassen der Hefe.

An eine direkte Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe ist kaum zu denken. Die Konstitution der aliphatischen (a) und aromatischen (b) Nitrokörper ist aller Wahr-

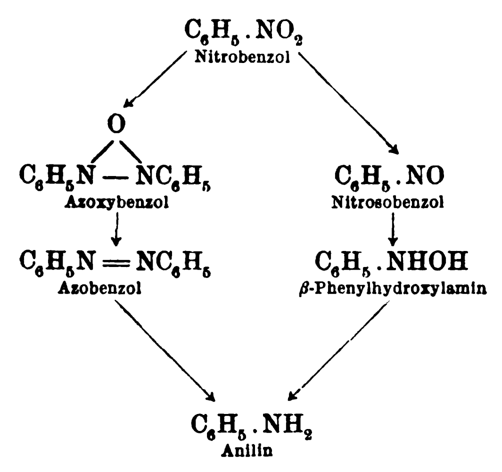
a) $-CH_2.NO_2 \rightleftarrows -CH:NOOH \rightleftarrows -CH\langle{}^{NOH}_{O}\rangle$ (NOH und O miteinander verbunden)

b) $\geqslant C.NO_2$ (mit Einfachbindung nach unten)

---

[1]) C. Neuberg und E. Welde, diese Zeitschr. 60, 472, 1914.

scheinlichkeit nach nicht die gleiche, so daß schon aus diesem Grunde ein intermediäres Auftreten verschiedener Zwischenstufen zu erwarten sein dürfte. Diese selbst zu fassen, ist bekanntlich auch in vitro nur ausnahmsweise möglich, und ein solcher Versuch ist bei biologischen Experimenten von vornherein wenig erfolgversprechend. Dagegen kann man einen anderen Weg beschreiten, den wir bereits früher angekündigt haben: die Prüfung, ob die denkbaren Zwischenstufen einer phytochemischen Reduktion zugänglich sind. Von diesem Gesichtspunkte aus haben wir verschiedene zwischen Nitrobenzol und Anilin stehende Produkte auf ihr Verhalten gegen Hefen untersucht, und zwar einerseits Nitrosobenzol und β-Phenylhydroxylamin, andererseits Azoxybenzol und Azobenzol:



Nur die auf der rechten Seite des Schemas stehenden, 1 N-Atom enthaltenden Formen von Zwischenstufen werden nach unseren Erfahrungen durch gärende Hefe zu Anilin reduziert, während uns die Azoderivate bisher kein Anilin ergaben; ob dieses unter anderen Versuchsbedingungen der Fall ist, bleibe dahingestellt.

Die experimentelle Handhabung ist bei allen erwähnten Körpern prinzipiell dieselbe, die wir früher bei der Reduktion des Nitrobenzols beschrieben haben. Sie ist jedoch insofern schwieriger als dort, als hier feste Körper vorliegen, die sich weniger leicht in dem Gärgut verteilen. Die Substanzen sind zwar in allen Fällen in alkoholischen Lösungen den Hefenansätzen zu-

gefügt worden, es ist jedoch unvermeidlich, daß ein Teil hierbei wieder ausfällt.

Die Ausbeuten an Anilin betrugen bei Verwendung von 21 g Nitrosobenzol 4,0 g Anilin, bei Zugabe von ebensoviel Phenylhydroxylamin 7,5 g Anilin. Daneben entsteht in beiden Fällen Azobenzol, das wir in reinem Zustande isoliert haben und dessen Bildung leicht verständlich ist. Was aus dem Rest der Ausgangsmaterialien wird, haben wir nicht ermittelt.

Die bekannte Empfindlichkeit des Phenylhydroxylamins ist wohl der Grund, daß auch in den stets vorgenommenen Kontrollversuchen mit abgetöteter Hefe deutliche Mengen an Anilin erhalten wurden, allerdings nur etwa die Hälfte der Anilinquantität, die beim Versuch mit lebender Hefe isoliert wurde. Beim Nitrosobenzol ergab die Kontrolle mit toter Hefe zwar ein rasches Verschwinden der ursprünglichen Substanz, jedoch trat dabei Anilin nur in sehr geringem Umfange auf[1]).

Bemerkenswert ist, daß Phenylhydroxylamin in der angewandten Konzentration die Gärung überhaupt nicht merklich hemmt, und daß auch Nitrosobenzol nur eine vorübergehende Verlangsamung hervorruft.

Die Resultate unserer Versuche sprechen demnach mit einiger Wahrscheinlichkeit dafür, daß die phytochemische Reduktion der Nitrogruppe über die Stufen des Nitroso- und Hydroxylaminrestes gehen kann.

Die Reduktion des Nitrosobenzols ist insofern noch von Interesse, als auch eine primäre Bildung von Nitrosoderivaten in der Pflanze durchaus im Bereich der Möglichkeiten liegt. Denn bei den Nitrifikationsprozessen entstehen auch Nitrite, und Nitrosoderivate können als einfachste organische Abkömmlinge der

---

[1]) Das Nitrosobenzol verhält sich gegen tote Hefe nicht viel anders als Nitrobenzol. Daß die organische Substanz der Hefe an sich — ohne gleichzeitigen Ablauf eines Gärungsaktes — kleine Mengen Nitrobenzols reduziert, haben wir früher angegeben und wollen bemerken, daß wir inzwischen zufällig auf eine an versteckter Stelle stehende ältere Angabe von E. Pozzi-Escot (Bull. de l'Association de Chim. de Sucr. et Dist. 21, 1073) gestoßen sind, wonach auch ein verdünnt alkoholischer Auszug von Hefe einige Tropfen zugesetzten Nitrobenzols in Anilin verwandeln kann.

salpetrigen Säure (c) aufgefaßt werden, wie die Nitroderivate als entsprechende Abkömmlinge der Salpetersäure (d):

c) $$R.H + HO.NO = H_2O + R.NO,$$

d) $$R.H + HO.NO_2 = H_2O + R.NO_2.$$

Experimenteller Teil.

1. Azobenzol.

Ein Gemisch von 500 g Rohrzucker, 5000 ccm Leitungswasser und 500 g Hefe (Rasse XII des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin) wurde in einer 5-l-Flasche in lebhafte Gärung versetzt. Dann wurden 15 g Azobenzol, gelöst in ungefähr 50 ccm 90%igem Alkohol, langsam zugesetzt. Die Gärung wurde kaum merklich gehemmt. Nach 5tägigem Stehen zuerst bei Zimmertemperatur und dann im Brutschrank war der Zucker vergoren. Der Inhalt der Flasche wurde nun in ein großes Destillationsgefäß aus Kupfer übergeführt, die Flüssigkeit deutlich alkalisch gemacht und mit Dampf überdestilliert. Das etwa 2 l betragende wässerige Destillat wurde hierauf mit Schwefelsäure angesäuert und nochmals der Dampfdestillation unterworfen. Dabei verflüchtigten sich jedesmal deutliche Mengen von unverändertem Azobenzol, das sich zum größten Teil in den typischen roten Krystallen im Kühler absetzte.

Nachdem das übergehende Destillat rein wässerig und klar geworden war, wurde die Destillation unterbrochen, der Destillationsrückstand mit Kalilauge gerade alkalisch gemacht und von neuem destilliert. Dies etwa 1 l betragende Destillat wurde ausgeäthert und der Äther nach dem Trocknen über entwässertem Natriumsulfat abdestilliert. Es hinterblieb eine kleine Menge gelblichen Öles, die wohl qualitativ Anilinreaktionen (Chlorkalk- und Diazoprobe) gab, die jedoch keinen richtigen Siedepunkt zeigte. Im ganzen betrug die Menge des Ätherrückstandes höchstens 0,5 g.

2. Azoxybenzol.

Der Göransatz wurde mit 500 g Zucker, 5 l Wasser und 500 g Hefe XII unter Zusatz von 15 g Azoxybenzol (in Alkohol gelöst) in genau derselben Weise gemacht, 5 Tage stehen gelassen und dann der Destillation unterworfen, wie zuvor beschrieben ist. Hier wurde bei der Destillation aus saurer Lösung ebenfalls

Azobenzol erhalten, dagegen konnte aus dem Destillat der alkalischen Destillation auch hier keine meßbare Menge reinen Anilins isoliert werden.

3a. Nitrosobenzol.

Zu einem Gäransatz von 500 g Zucker, 5 l Wasser und 500 g Hefe XII wurde im Verlauf von einigen Stunden die Lösung von 21,4 g ($^2/_{10}$ mol.) Nitrosobenzol hinzugesetzt. Die Gärung wurde hierbei deutlich verlangsamt, erholte sich jedoch später wieder vollständig. Nach 5tägigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur und im Brutschrank wurde das Gärgut der Dampfdestillation unterworfen, indem zuerst aus alkalischer Lösung destilliert und dann das Übergegangene noch einmal in schwefelsaurer Lösung mit Dampf behandelt wurde; dieses Destillat wurde ausgeäthert.

Der nach dem Abdunsten des sauren Ätherextrakts hinterbliebene Rückstand erstarrte zu einer roten strahligen Masse, die sich nach dem Umkrystallisieren aus Ligroin als reines Azobenzol vom Schmelzpunkt 68° erwies.

Der schwefelsaure Destillationsrückstand wurde alkalisch gemacht und abermals mit Dampf behandelt. Das Destillat wurde dann erschöpfend ausgeäthert, der Äther über Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Als Rückstand des alkalischen Ätherauszugs hinterblieb ein gelbliches Öl, das der fraktionierten Destillation unterworfen wurde. Nachdem wenige Tropfen einer mercaptanähnlich riechenden wasserklaren Flüssigkeit übergegangen waren, stieg das Thermometer unmittelbar auf 180° und es wurden 4,0 g reines Anilin vom Siedepunkt 180 bis 183° erhalten.

Das Anilin wurde qualitativ durch die Reaktionen mit 1,2 Naphthochinonsulfosäure(-4) und mit Chlorkalk nachgewiesen und sein Vorliegen durch die Analyse des erhaltenen Anilins und des daraus dargestellten Anilinsulfats erhärtet.

1. 0,1578 g gaben 0,4462 g CO_2 und 0,1053 g H_2O.
   C_6H_7N Ber.: C = 77,42, H = 7,53 %;
   gef.: C = 77,17, H = 7,48 %.

2. 0,2892 g Sulfat gaben 0,2439 g $BaSO_4$ (= 0,0334 g S).
   $(C_6H_7N)_2H_2SO_4$ Ber.: S = 11,27 %;
   gef.: S = 11,57 %.

3b. Versuch mit Nitrosobenzol und abgetöteter Hefe.

500 g Hefe XII wurden in 2500 g Wasser 1 Stunde lang auf 100° erhitzt. Gleichzeitig wurden 500 g Zucker durch Erwärmen mit 2300 ccm Wasser und 100 ccm n-Schwefelsäure invertiert, mit 100 ccm n-Natronlauge neutralisiert und dann der Hefenabkochung zugefügt. Nach dem Erkalten wurden dieser Mischung 21,4 g Nitrosobenzol, in Alkohol gelöst, zugesetzt. Der Ansatz blieb genau wie zuvor beschrieben stehen und wurde nach 5 Tagen verarbeitet. Wir erhielten bei der Destillation aus saurer Lösung kein Nitrosobenzol zurück, dagegen etwas Azobenzol. Das Destillat aus alkalischer Lösung ergab nach dem Ausäthern 0,8 g Anilin vom Siedepunkt 179 bis 183°.

4a. β-Phenylhydroxylamin.

Zu einem Gäransatz von 500 g Rohrzucker, 500 g Hefe XII und 5000 g Wasser wurde die alkoholische Lösung von 21,8 g Phenylhydroxylamin allmählich hinzugesetzt. Hierbei war kaum eine Hemmung der Gärung zu konstatieren. Nach 5 tägigem Stehenlassen wurde der Ansatz in der mehrfach beschriebenen Weise der Destillation unterworfen. Das Destillat aus saurer Lösung ergab nach dem Ausäthern gegen 2 g reines Azobenzol in roten charakteristischen Krystallen, die auf Ton abgepreßt richtig bei 67 bis 68° schmolzen.

Das Destillat aus der alkalischen Lösung hinterließ nach dem Ausäthern und Abdestillieren des Äthers ein helles Öl, das beim Rektifizieren 7,5 g reines Anilin vom Siedepunkt 180 bis 183° und mit den charakteristischen Reaktionen ergab. Zur Analyse wurde ein Teil in das Sulfat verwandelt.

0,2866 g Sulfat gaben 0,2323 g $BaSO_4$ (= 0,0319 g S).

$(C_6H_7N)_2H_2SO_4$ Ber.: S = 11,27%;
gef.: S = 11,10%.

4b. Der Versuch mit abgetöteter Hefe wurde in genau derselben Weise angesetzt, wie unter 3b beschrieben ist. Es waren 21,8 g Phenylhydroxylamin in alkoholischer Lösung zugegeben worden. Die weitere Verarbeitung ergab deutliche Mengen von Azobenzol, und aus dem Destillat der alkalisch gemachten Lösung konnten 3,8 g reines Anilin isoliert werden.

Phytochemische Reduktionen. VI.

Bildung von n-Hexylalkohol durch Hefe.

Von

C. Neuberg und F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Reduzierbarkeit der aliphatischen Aldehyde mit gerader oder verzweigter Kohlenstoffkette zu den entsprechenden Alkoholen durch Hefe ist an einer größeren Reihe von Beispielen durchgeführt worden. Bisher haben sich alle einfachen Aldehyde bis zur Reihe C_5 und der Heptylaldehyd der Reduktion durch Hefe, wenn auch mit verschiedener Leichtigkeit und in wechselndem Umfange, als zugänglich erwiesen[1]).

Insbesondere hatte es sich bei diesen Untersuchungen gezeigt, daß der kohlenstoffreichste der bisher geprüften Aldehyde, das Önanthol (n-Heptylaldehyd), der phytochemischen Reduktion den stärksten Widerstand entgegensetzt. Es hat nicht den Anschein, als ob dieses Verhalten allein mit der Größe des Molekulargewichtes zusammenhängt, da zwischen der Reduzierbarkeit der verschiedenen Aldehyde mit 3, 4 und 5 Kohlenstoffatomen keine sehr deutlichen Differenzen bestehen. Vielmehr dürfte die sprunghafte Änderung mit dem Umstande zusammenhängen, daß der Aldehyd der C_7-Reihe eine dem Stoffwechsel der Hefe wohl völlig fremde Substanz ist und sich so als schädigend und als schwerer angreifbar erweist.

Mit der Geradlinigkeit der Kohlenstoffkette darf man diese Verhältnisse kaum in Zusammenhang bringen. Denn

[1]) C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1912 bis 1914.

auch der von uns jüngst untersuchte n-Valeraldehyd[1]) kann ebenso glatt wie die verzweigten Valeraldehyde von Hefe in den entsprechenden n-Amylalkohol übergeführt werden. Freilich dürfte nach unseren Ausführungen der n-Valeraldehyd infolge seiner Verwandtschaft mit dem Eiweißspaltungsprodukte Norleucin dem Organismus der Hefe nicht fremd sein.

Wegen der Beziehung zu all diesen Fragen schien es nun nicht uninteressant, den zwischen n-Heptylaldehyd und n-Valeraldehyd stehenden n-Capronaldehyd auf sein Schicksal bei der Einwirkung von Hefe zu untersuchen.

In der Tat zeigt diese Substanz ein Verhalten, das etwa zwischen dem des n-Heptan- und n-Pentanderivates in der Mitte steht: Gärende Hefe führt den n-Capronaldehyd langsam und in mittlerer Ausbeute in n-Hexylalkohol über. Für die gleichzeitige Bildung von n-Capronsäure haben wir keinerlei Anhaltspunkte gefunden.

Der isolierte Gärungshexylalkohol erwies sich als völlig rein.

Es sei schließlich darauf hingewiesen, daß n-Hexylalkohol angeblich auch in den Fuselölen aus Korn, Eicheln und Weintrebern sowie im Öl der Früchte und Samen verschiedener Heracleumarten gefunden worden ist. Die Konstitution dieses Hexylalkohols steht allerdings hier ebensowenig fest wie die der natürlich vorkommenden Capronsäuren, eine Tatsache, die Neuberg und Rewald[2]) bei der Synthese der aktiven Capronsäuren hervorgehoben haben und die immer wieder betont werden muß.

Experimentelles.

Als Ausgangsmaterial stand uns reiner n-Capronaldehyd zur Verfügung, für dessen Überlassung wir der chemischen Fabrik Schimmel & Co. in Miltitz bei Leipzig auch an dieser Stelle besonders danken möchten.

Nochmalige Rektifikation ergab, daß der n-Capronaldehyd nahezu völlig zwischen 125,5° bis 127° siedete.

Die Gärversuche selbst wurden mit zwei Heferassen angesetzt: mit der untergärigen Hefe K und der obergärigen Hefe M.

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. 62, 482, 1914.

[2]) C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. 9, 403, 1908.

a)

Zu einem in Gärung befindlichen Gemisch von 300 g Rohrzucker, 3000 ccm Leitungswasser und 300 g Hefe M wurden tropfenweise 21 g n-Capronaldehyd gefügt. Die Gärung verminderte sich zusehends und war beim Stehen bei Zimmertemperatur nach einigen Stunden vollkommen erloschen, obgleich noch erhebliche Mengen unzersetzten Zuckers zugegen waren. Auch beim Verweilen im Brutschrank kam die Gärung nicht in Gang. Sie setzte jedoch wieder ein auf Zugabe von 150 g Hefe und 100 g Zucker. — Nach ungefähr 36 Stunden hörte die Gärung abermals auf, und es war bis zum vollständigen Verschwinden des Traubenzuckers ein allmählicher Zusatz von insgesamt 700 g Hefe und noch von 200 ccm Wasser notwendig. Am 13. Tage wurde das gesamte Gärgut unter Nachspülen in zwei kupferne Destillierblasen übergeführt und mit Wasserdampf behandelt.

Von den 4600 ccm des Gärguts wurden zuerst 2800 ccm abdestilliert und dieses Destillat dann ohne Anwendung von Wasserdampf zur Hälfte übergetrieben.

Nach zweimaliger Ausätherung des Rückstands wurde der übergegangene Anteil 6 mal gründlich mit je 150 ccm Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte wurden 3 mal mit je 220 ccm 20%iger Bisulfitlösung geschüttelt, mit wenig Wasser gewaschen und über geglühtem Natriumsulfat getrocknet.

Die Hauptmenge des Äthers wurde alsdann auf dem Dampfbade abgetrieben und der Rückstand über frisch entwässertem Kupfersulfat nochmals 24 Stunden getrocknet. —

Die in den früheren Arbeiten beschriebene systematische Aufarbeitung am Birectificator[1]) ergab 5,5 g n-Hexylalkohol vom Siedepunkt 155 bis 160°.

Außerdem wurde etwa 1 g einer höher siedenden Fraktion erhalten, die ganz neutral reagierte, in verdünnter Lauge unlöslich, also sicher keine Capronsäure war.

b)

Zwei entsprechende Ansätze wurden mit der untergärigen Hefe K angestellt, und zwar bestand das ursprüngliche Gärungs-

[1]) Des hohen Siedepunktes wegen konnte nur ein zweikugeliger verwendet werden.

gemisch aus je 300 g Zucker, 300 g Hefe und 3000 ccm Leitungswasser sowie 10,5 g n-Capronaldehyd. Die Erscheinungen der Gärungsverzögerung und deren Behebung durch fortgesetzte Nachfüllung von Hefe, Wasser und Zucker gestalteten sich genau wie sub a). Die Aufarbeitung erfolgte hier auch am 13. Tage.

Das Gärgut der beiden letzten Ansätze zusammen belief sich schließlich auf 9960 ccm, die aus einem 30 l fassenden Kessel der Wasserdampfdestillation unterworfen wurden.

Die Aufarbeitung in der geschilderten Weise ergab jetzt 9,5 g n-Hexylalkohol vom Siedepunkt 154 bis 160°.

Die Ausbeute ist unter diesen Umständen fast doppelt so groß wie bei Versuch a). Auch hier ist keinerlei Anhaltspunkt für das Auftreten von Capronsäure gewonnen worden.

Durch erneute Fraktionierung wurde für die Analyse ein n-Hexylalkohol erhalten, der bei 762 mm zwischen 156 bis 157° sott.

0,1444 g Subst. gaben 0,3705 g CO_2, 0,1779 g H_2O;
0,1177 g „ „ 0,3023 g „ 0,1464 g „ .

$C_6H_{14}O$ (102) ber.: C = 70,59, H = 13,72 %;
gef.: C = 70,01, H = 13,75 %,
und C = 70,05, H = 13,80 %.

Auch die Darstellung der schwerlöslichen α-Naphthylisocyanatverbindung gelang.

Die Reduktion des n-Hexylaldehyds zu n-Hexylalkohol ist also durch Einwirkung von Hefen möglich.

Kommen im Harn den Kresolen isomere Substanzen, „Urogol“ und „Urogon“, vor?

Von

C. Neuberg und L. Czapski.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Vor einigen Jahren hat W. Mooser[1]) angegeben, daß im Kuhharn in der Fraktion der Phenole neben den lange bekannten Kresolen ($CH_3 . C_6H_4 . OH$) ein gleich zusammengesetzter, aber isomerer Körper vorkomme, den er geneigt ist, für einen Vertreter der Terpengruppe zu halten. Diesen Körper nennt er Urogon (C_7H_8O) und glaubt ihm Ketoncharakter zuschreiben zu sollen. Bei Behandlung mit wässeriger Kalilauge soll daraus ein Kohlenwasserstoff ($C_{21}H_{42}$), das Urogen, und ein wiederum dem p-Kresol isomerer, phenolartiger Körper, das Urogol (C_7H_8O), entstehen.

An sich wäre das Vorkommen eines der hydroaromatisch Reihe angehörigen Körpers im Kuhharn gar nicht so unwahrscheinlich, da ja die Herbivoren reichlich Gelegenheit haben, mit den Vegetabilien Substanzen der Terpengruppe aufzunehmen.

Der Befund Moosers gewann dann durch die Mitteilung von Fricke[2]) an Interesse, daß Urogon nicht nur im Harn einiger Haustiere (Pferd, Esel, Schaf, Ziege, Schwein und Hund), sondern auch im Menschenharn vorhanden sei.

Schon früher hat der eine von uns[3]) kurz angegeben, daß ihm die Reindarstellung dieser Körper aus Rinderharn nicht gelungen sei.

---

[1]) W. Mooser, Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**, 181, 1909.
[2]) E. Fricke, Arch. f. d. ges. Physiol. **156**, 225, 1914.
[3]) Neuberg, „Der Harn“ I, 518, 1911.

Welche Bewandtnis es auch mit dem Kohlenwasserstoff (Urogen) haben mag, auffällig ist von vornherein die Existenz zweier Kresolhomologen, von denen eins Keton-, das andere Phenolnatur besitzen, aber mit keinem der drei Kresole identisch sein soll.

Unter diesen Umständen schien uns eine Nachprüfung der Grundlage wünschenswert, auf die Mooser die Isolierung seines Ausgangsmaterials, des Urogons, gründet.

Die Methodik der Isolierung des Urogons bestand kurz in folgendem:

Der auf $^1/_{10}$ seines Volumens eingedampfte Kuhharn wird portionsweise zu je 500 g mit 25 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und destilliert, bis im letzten Destillate keine Millonsche Reaktion mehr erzeugt werden kann. Das Destillat wird nach Übersättigung mit Calciumcarbonat unter Einleitung von Kohlensäure nochmals in mehreren Portionen destilliert. Hierbei geht neben den Phenolen und Kresolen ein Öl über. Die Tennung dieses Öles geschieht nach Mooser folgendermaßen:

„Die übergegangenen Portionen werden mit Kalilauge leicht alkalisch gemacht und durch eine erstmalige Ausschüttelung mit reinstem Petroläther im Scheidetrichter die Hauptmenge des Öles daraus gewonnen. Die wässerige alkalische, die Phenole enthaltende Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade konzentriert, nochmals extrahiert und nach Entzug des Ölrestes mit verdünnter Schwefelsäure leicht übersäuert.“

Die Petrolätherextraktion der sauren Flüssigkeit ergab dann in gewohnter Weise Parakresol, die der schwach alkalischen Flüssigkeit das Urogon.

Der springende Punkt der von Mooser geübten Methodik liegt in der Annahme, daß aus schwach alkalischer Lösung Phenol bzw. Kresol durch Petroläther nicht extrahierbar sei. Obgleich der Autor[1]) angibt, sich von diesem Umstande überzeugt zu haben, ist ihm hier jedoch ein Irrtum unterlaufen, der die Ergebnisse seiner Untersuchungen über die Körper der Urogonreihe völlig in Frage stellt.

Es läßt sich durch die einfachsten Versuche dartun, daß einer leicht alkalischen Phenollösung durch

---

[1]) l. c. S. 193 bis 194.

Petroläther ein sehr erheblicher Teil der Phenole entzogen wird[1]). An verschiedenen Stellen ihrer Mitteilung geben Mooser und Fricke an, die Fraktion der Roh-Phenole mit Lauge „leicht" alkalisiert zu haben.

Kräftig alkalische Reaktion tritt nun bereits ein, wenn man zu 100 ccm einer 4,7 $^0/_0$igen Phenollösung ($^n/_2$-Phenol) 1,2 ccm n-Kalilauge fügt. Für 100 ccm einer 5,4 $^0/_0$igen p-Kresollösung ($^n/_2$-Kresol) sind 1,3 ccm n-Kalilauge erforderlich. Diese Reaktion gilt gegenüber Phenolphthalein als Indicator; nimmt man Lackmus als Indicator, so bewirkt praktisch schon der Zusatz des ersten Tropfens n-Lauge Blaufärbung!

Es kann also nicht zweifelhaft sein, daß Mooser bei seiner Methodik als Urogon zum mindesten einen sehr erheblichen Teil gewöhnlicher Harnphenole isoliert hat. Auch die weitere Reinigung, die Mooser[2]) mit dem Urogon vornimmt, ändert daran nichts.

Er extrahiert zwecks „Reinigung" beispielsweise 20 g Urogon nach Zugabe von 20 ccm 10 $^0/_0$iger Kalilauge im Extraktionsapparat erschöpfend mit Petroläther und gewinnt nach seinen eigenen Angaben das angewandte Öl dabei nahezu vollständig zurück.

Selbst bei Zugabe einer solchen Quantität Lauge, daß mehr als ein Molekül Alkali auf ein Molekül Phenole kommt, liefert die erschöpfende Extraktion im Perkolator einen Extrakt, der freie Phenole enthält. (Siehe Versuch a und b.)

Versuch a: 100 ccm einer 4,9 $^0/_0$igen (0,53 n-) Phenollösung werden mit 60 ccm n-Kalilauge versetzt und 8 Stunden mit Petroläther extrahiert.

Nach Aufnahme des Auszugs in 80 ccm Wasser und Abdunsten des Petroläthers gibt eine Probe des Extraktes die Millonsche Reaktion sowie die Probe mit Bromwasser.

Versuch b: 5,4 g Parakresol werden in 60 ccm n-Kalilauge gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt und 8 Stunden mit Petroläther extrahiert.

---

[1]) Analytisch läßt sich auch eine Abnahme der Phenole in der wässerigen, mit Petroläther erschöpften Lösung unschwer nachweisen.

[2]) l. c. S. 183.

Nach Zusatz von 80 ccm Wasser zum Auszuge und Abdunsten des Petroläthers gibt eine Probe des Extraktes die Millonsche Reaktion, mit Eisenchlorid Blaufärbung, mit Bromwasser einen Niederschlag und beim Erwärmen mit Salpetersäure Gelbfärbung.

Diese Abgabe von freiem Phenol und Kresol selbst aus mit Kalilauge übersättigter Lösung an Petroläther hängt offenbar mit der Dissoziation der Phenolate zusammen und findet in der schwachen Säurenatur der Phenole ihre Erklärung.

Wir glauben, daß unsere Versuche die Annahme rechtfertigen, daß Urogon und Urogol mehr oder minder verunreinigtes Kresol darstellten. Die von Mooser angegebenen physikalischen Eigenschaften des Urogons (Kp 199,9°) und des Urogols (Kp 207,6°) sowie die chemischen Reaktionen beider Körper — d. h. ihr Verhalten zu Bromwasser, Millons Reagens, Eisenchlorid und Jodjodkalium — sprechen durchaus in gleichem Sinne. Ob daneben höher siedende Beimengungen an hydroaromatischen Substanzen vorhanden sind, muß dahingestellt bleiben. Ebenso scheint uns die Abstammung des Kohlenwasserstoffes (Urogen) unsicher.

Die Valeraldehyd- und Amylalkoholgärung der Methyläthylbrenztraubensäure.

Von

C. Neuberg und W. H. Peterson.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Für eine Reihe von α-Ketosäuren haben Neuberg und Mitarbeiter zeigen können, daß sie der zuckerfreien Gärung fähig sind. Durch lebende Hefen sowie durch ein in ihnen enthaltenes Ferment, die Carboxylase, werden diese α-Ketosäuren in Kohlendioxyd und den entsprechenden Aldehyd

$$R.CO.CO_2H = CO_2 + R.COH$$

gespalten. Diese Aldehyde können sodann sekundär zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden.

Das niedrigste Glied aus der Reihe der α-Ketosäuren, die Brenztraubensäure, steht in durchsichtigen Beziehungen zum Molekül des Traubenzuckers, während die homologen und substituierten Brenztraubensäuren mit Spaltungsprodukten der Eiweißkörper, den α-Aminosäuren, chemisch wie biologisch verknüpft sind. In den α-Ketosäuren begegnen sich die ersten Abbauprodukte der wichtigsten stickstofffreien und stickstoffhaltigen Zellbausteine.

Es ist nun in hohem Grade bemerkenswert, daß alle bisher untersuchten α-Ketosäuren, die sich von Naturprodukten ableiten, der zuckerfreien Gärung fähig sind.

Diese Eigenschaft weist auf wichtige Zusammenhänge hin. Um weiteres Material für diese Fragen zu gewinnen, haben wir die bisher nicht geprüfte Methyläthylbrenztraubensäure

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! CH—CO—COOH,$$

auf ihr Verhalten zu Hefefermenten untersucht.

Verdünnte wässerige Lösungen der Methyläthylbrenztraubensäure geraten mit ober- und untergärigen Hefen alsbald in Gärung.

Am energischsten wirkt die Oberhefe XII (des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin). Auch Macerationssäfte aus untergäriger und obergäriger Hefe bringen die Substanz zur Gärung. Die Vergärung der Methyläthylbrenztraubensäure kann also auf rein enzymatischem Wege, losgelöst vom Leben der Hefen, bewerkstelligt werden.

Wenn auch die Gärungserscheinungen bei der Methyläthylbrenztraubensäure nicht so stürmisch wie bei der Brenztraubensäure selbst verlaufen, so wird man dieselben doch wohl dem gleichen Ferment, der Carboxylase, zuschreiben dürfen. Dieses Enzym ist vielleicht den verschiedenen Substraten (Brenztraubensäure, α-Ketopropionsäure, Oxalessigsäure, α-Ketoglutarsäure, den aromatischen Ketosäuren und der Methyläthylbrenztraubensäure) in etwas verschiedener Weise angepaßt; es spaltet sie ungleich stark, ähnlich wie das Emulsin die einzelnen β-Glucoside mit wechselnder Kraft zerlegt. Selbstverständlich könnten auch verschiedene Carboxylasen vorliegen, doch scheint ihre einheitliche Betrachtung bei den nahen Beziehungen der Substrate vorläufig angebracht.

Die zuckerfreie Gärung von Methyläthylbrenztraubensäure verläuft nun ihrem Wesen nach ganz analog der von einfacher Brenztraubensäure. Als erstes Spaltungsprodukt entsteht neben Kohlensäure Methyläthylacetaldehyd,

$$\begin{matrix} CH_3 \diagdown \\ C_2H_5 \diagup \end{matrix} CH-CHO,$$

der in kleiner Menge auch als solcher zu fassen ist, hauptsächlich jedoch zu dem entsprechenden Amylalkohol, dem Methyläthylcarbincarbinol,

$$\begin{matrix} CH_3 \diagdown \\ C_2H_5 \diagup \end{matrix} CH-CH_2OH,$$

reduziert wird. Daneben treten in nicht unbeträchtlicher Quantität auch neutrale wie saure Kondensationsprodukte auf, die teils den Charakter einfacher Aldole, teils den von Substitutions-

produkten der α-Ketovalerolacetoncarbonsäure[1]) haben, sowie auch eine flüchtige Fettsäure, die Valeriansäure,

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! CH-COOH.$$

Der Beginn des Zerfalls von Methyläthylbrenztraubensäure unter dem Einflusse der Carboxylase gibt sich außerordentlich schnell zu erkennen. Schon nach ungefähr 2 Minuten tritt bei der Verwendung einer $0{,}75\,^0/_0$igen Säure und lebender Hefe in dem vorher fast geruchlosen Gärgut ein charakteristischer Geruch nach Valeraldehyd und Amylalkohol auf. Diese Umsetzung der Methyläthylbrenztraubensäure kann somit geradezu für eine Demonstration der zuckerfreien Gärung dienen.

Die Menge an reinem Amylalkohol, die wir isolierten, war wegen des Auftretens der erwähnten anderen Produkte nicht groß.

Wir konnten in Substanz nur 4,7 g bei Verarbeitung von 60 g Methyläthylbrenztraubensäure abscheiden.

Hierbei sind jedoch auch die folgenden Punkte zu berücksichtigen. Es entsteht daneben, wie erwähnt, Methyläthylacetaldehyd, ferner Valeriansäure und verschiedene höhere Kondensationsprodukte. Die Abtrennung dieser verschiedenen Reaktionsprodukte aus dem Gärgut und ihre Scheidung ist keineswegs leicht und quantitativ.

Theoretisch könnte ein Molekül Methyläthylbrenztraubensäure (Molekulargewicht 130) ein Molekül Amylalkohol (Molekulargewicht 88) liefern.

Nun ist das verwandte Ausgangsmaterial,

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! \overset{*}{C}H.CO.COOH,$$

eine racemische Verbindung, deren vollständige Zerlegbarkeit durch die Carboxylase zweifelhaft erscheinen muß.

Die polarimetrische Untersuchung des isolierten Amylalkohols tat ohne weiteres den asymmetrischen Angriff der Methyläthylbrenztraubensäure durch die Hefenfermente dar und gab zugleich interessante Aufschlüsse über die Art, wie die zuckerfreie Gärung verläuft.

---

[1]) Vgl. C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge, Monographie, **1913**, S. 35.

Der entstandene Amylalkohol erwies sich als optisch aktiv, und zwar als linksdrehend. Es war der bei der Vergärung der natürlichen Maischen und Melassen auftretende, linksdrehende d-Amylalkohol[1]) gebildet worden. Derselbe hatte die spezifische Drehung gleich — 1,75°, bestand also zu rund 30% aus der aktiven Form, die hier zum ersten Male durch zuckerfreie Gärung und Abbau aus nicht stickstoffhaltigem Material erhalten worden ist.

Wie hat man nun die Entstehung des aktiven Alkohols zu deuten?

Es bestehen zwei Möglichkeiten: Von den Komponenten der Methyläthylbrenztraubensäure kann eine Form vollständiger als die andere durch die Carboxylase gespalten worden sein, so daß optisch-aktiver Valeraldehyd im Überschuß und daraus optisch-aktiver Amylalkohol entstanden ist. Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß die Carboxylasespaltung der Methyläthylbrenztraubensäure zwar symmetrisch verlaufen ist, die Reduktion des gebildelen Methyläthylacetaldehyds aber asymmetrisch vor sich geht. Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten war durch die optische Untersuchung des noch unzerlegten Anteils der Methyläthylbrenztraubensäure im Gärgut gegeben. Besitzt der restierende Anteil der Methyläthylbrenztraubensäure ein Drehungsvermögen, so ist daraus mit großer Wahrscheinlichkeit auf die asymmetrische Spaltung dieser Säure selbst unter dem Einflusse der Carboxylase zu schließen.

Die Prüfung des unangegriffenen Teils der Methyläthylbrenztraubensäure ergab, daß die ursprünglich racemische Säure aktiv geworden war, und zwar befand sich im Rückstande eine stark linksdrehende Methyläthylbrenztraubensäure. Daß dieselbe in völlig reiner Form vorgelegen hat, ist unwahrscheinlich. Denn der Umstand, daß der isolierte Amylalkohol nur zu 30% optisch-aktiv war, zeigt, daß wohl beide Komponenten der Methyläthylbrenztraubensäure durch Carboxylase angegriffen werden, wenn auch in ungleichem Ausmaße.

Im Einklang mit all diesen Tatsachen steht, daß auch der

---

[1]) Entsprechend dem Vorschlag von W. Marckwald (Ber. 35, 1599, 1902) wird im folgenden der linksdrehende natürliche Amylalkohol als d-Amylalkohol bezeichnet. Da die Valeraldehyde und Valeriansäuren dem Alkohol entgegengesetzt drehen, so werden die lävogyren Formen des Methyläthylacetaldehyds und der Methyläthylessigsäure l-Derivate benannt.

in kleiner Menge isolierte und als Zwischenprodukt zu betrachtende Methyläthylacetaldehyd linksdrehend[1]) befunden wurde und die erhaltene Valeriansäure sich gleichfalls als lävogyr erwies.

Diese Daten ermöglichen, uns ein Bild von den Vorgängen bei der Amylalkoholgärung der Methyläthylbrenztraubensäure zu machen. Dieselbe vollzieht sich folgendermaßen:

In der ersten Phase der Reaktion wird die d, l-Methyläthylbrenztraubensäure durch die Carboxylase in typischer Weise zerlegt, wobei CO_2 und Valeraldehyd auftreten. Dabei wird diejenige Form der Säure, die d-Methyläthylacetaldehyd liefert, in größerem Umfange oder schneller gespalten.

In der zweiten Phase werden der entstandene d-Valeraldehyd und seine daneben gebildete l-Form hydriert, wobei Amylalkohol mit einem Überschuß von $30\,^0/_0$ an der d-Komponente erzeugt wird. Offenbar gehen die Umwandlungen der zum d-Amylalkohol führenden Formen so rasch vor sich, daß etwas vom linksdrehenden l-Valeraldehyd nachweisbar bleibt.

Als dritte Reaktion vollzieht sich daneben eine Bildung von l-Valeriansäure; es muß dahingestellt bleiben, ob diese Valeriansäure durch eine Oxydation des l-Methyläthylcetaldehyds oder durch eine Cannizzarosche Umlagerung aus diesem l-Valeraldehyd entsteht. Die optische Aktivität der Valeriansäure zeigt jedenfalls, daß sie nicht eine Verunreinigung des Ausgangsmaterials darstellt. Sie geht aus dem l-Valeraldehyd hervor, dessen Entstehung und Umwandlung von dem Schicksal des Antipoden eben etwas verschieden ist.

Aus unseren Versuchen ist zu folgern, daß der Methyläthylacetaldehyd sehr leicht zu dem entsprechenden Amylalkohol durch Hefe reduziert wird. Dies Verhalten befindet sich ganz in Übereinstimmung mit den Erfahrungen, die Neuberg und Steenbock[2]) bei der Reduktion des „Isovaler-

---

[1]) Der linksdrehende Valeraldehyd ist ein Derivat des natürlich nicht vorkommenden l-Amylalkohols.

[2]) C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. **52**, 494, 1913; **59**, 188, 1914.

aldehyds" und Neuberg und Nord[1]) bei der Reduktion des n-Valeraldehyds durch Hefe gemacht haben.

Wir glauben aber auch annehmen zu sollen, daß die zuckerfreie Gärung der Methyläthylbrenztraubensäure mit dem Problem der natürlichen Fuselölbildung in engem Zusammenhang steht. Nach den Untersuchungen von F. Ehrlich[2]) ist die Quelle des aktiven d-Amylalkohols der Fuselöle das d-Isoleucin, aus dem er ihn im Sinne der folgenden Formulierung ableitet:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! \overset{*}{C}H.CHNH_2.COOH + H_2O$$

$$= CO_2 + NH_3 + \begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! \overset{*}{C}H.CH_2OH.$$

Hinsichtlich einzelner Phasen dieser Reaktion haben bereits Neubauer und Fromherz[3]) (auf Grund des Befundes von Phenylglyoxalsäure bei der Vergärung von Phenylaminoessigsäure durch Hefe in Gegenwart von Zucker) die Vermutung ausgesprochen, daß die von zuckervergärender Hefe aus zugesetzten Aminosäuren erzeugten Alkohole über die intermediär auftretende α-Ketosäure gebildet werden. Die leichte Gärbarkeit der Methyläthylbrenztraubensäure spricht nun durchaus dafür, daß der Weg vom Isoleucin tatsächlich über diese Ketosäure führt. Da die Gärung der Methyläthylbrenztraubensäure auch mit Macerationssäften eintritt und mit demselben Fermentmaterial auch von Neuberg und Steenbock[4]) die Umwandlung der Valeraldehyde in Amylalkohol erreicht worden ist, sind somit alle Phasen — bis auf die Desaminierung der Aminosäure zur Ketosäure — losgelöst vom Leben der Zelle verwirklicht, d. h. als rein enzymatische Reaktionen erkannt worden.

Daß bei unseren Versuchen mit der d, l-Methyläthylbrenztraubensäure ein nur zu 30 % optisch-aktiver Amylalkohol erhalten wurde, steht natürlich in keiner Weise im Gegensatz zu diesen Darlegungen. Die Vergärung von natürlichem Isoleucin, die Ehrlich in Wirklichkeit einen höchstens 45 %igen

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. 62, 482, 1914.

[2]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. 2, 52, 1906; Ber. 40, 1030 u. 2551, 1907.

[3]) O. Neubauer und K. Fromherz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 326, 1911.

[4]) l. c.

(äthylalkoholhaltigen) d-Amylalkohol ergeben hat, müßte ja theoretisch zu der reinen aktiven Form führen. Denn die Desaminierung des aktiven Isoleucins liefert direkt **eine** aktive Form der Methyläthylbrenztraubensäure, die natürlich nur **einen** der aktiven Valeraldehyde und **einen** aktiven Amylalkohol ergibt. Die experimentellen Schwierigkeiten sind eben sehr groß.

Die Amylalkoholbildung aus Methyläthylbrenztraubensäure tut somit von neuem die Rolle der Carboxylase auch bei der Entstehung der höheren Alkohole dar.

Experimentelles.

1. Darstellung der racemischen Methyläthylbrenztraubensäure.

Für die Gewinnung der d, l-Methyläthylbrenztraubensäure hat Mebus[1]) eine Vorschrift gegeben, der wir im ganzen haben folgen können. Zunächst wird oxalsaures Äthyl mit propionsaurem Äthyl durch Natriumäthylat kondensiert und der entstandene Methyloxalessigester durch Jodäthyl in Gegenwart von Natrium in den Methyläthyloxalessigester übergeführt; bei der nachfolgenden Einwirkung von Säure liefert er unter Abspaltung von Kohlensäure und unter gleichzeitiger Verseifung die inaktive Methyläthylbrenztraubensäure.

Während die Darstellung des Methyloxalessigesters ohne Schwierigkeit vor sich geht, ist die Einführung des Äthyls kein glatt verlaufender Prozeß. Mebus gibt an, 50% Ausbeute an Methyläthyloxalessigester erhalten zu haben. Jedoch ist es uns nicht möglich gewesen, bei Befolgung seiner Vorschriften dieses Ergebnis zu erzielen. Wir erhielten dabei nur 20% der Theorie. Soweit aus der Angabe von Mebus hervorgeht, hat er Jodäthyl auf etwas überschüssigen Methyloxalessigester in Gegenwart von 1 Mol alkoholischen Natriumäthylats einwirken lassen.

Viel günstiger wird nun das Resultat, wenn man die Menge des Jodäthyls auf 2 Mol vermehrt und diese auf etwas (rund 10%) mehr als 1 Mol Methyloxalessigester in Gegenwart von 1 Mol alkoholfreiem Natriumäthylat einwirken läßt. Wir erhielten so eine Ausbeute von 60 bis 70%, gelegentlich von 80% der Theorie. Wir beschreiben einen Versuch genauer:

[1]) A. Mebus, Wiener Monatshefte 26, 483, 1905.

500 g reinster Methyloxalessigester (mol. Gew. 202) wurden zu 153 g alkoholfreiem Natriumäthylat langsam hinzugesetzt, wobei der Kolben von außen durch Eis gekühlt wurde. Dabei geht zunächst nicht alles Natriumäthylat in Lösung. Nach $^1/_2$ stündigem Stehen und häufigem Umschütteln wurden 700 g Jodäthyl tropfenweise hinzugefügt und nunmehr das Gemisch nach öfterem Umschütteln auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei erfolgt vollständige Lösung unter gleichzeitiger Gelbrotfärbung. Das Erhitzen auf dem Wasserbade, wobei Jodäthyl und Alkohol sieden, wird am Rückflußkühler unter peinlichem Ausschluß jeglicher Feuchtigkeit (Chlorcalciumrohr-Verschlüsse) 24 Stunden lang fortgesetzt. Dann wird am absteigenden Kühler Jodäthyl und Äthylalkohol nach Möglichkeit abdestilliert und die zurückbleibende teigartige Masse mit Wasser und verdünnter Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Kongo versetzt. Darauf wird erschöpfend mit Äther (10 mal) ausgeschüttelt und das Gemisch der Ätherauszüge mit Sodalösung, dann mit etwas Thiosulfatlösung zur Bindung einer kleinen Menge noch vorhandenen Jods[1]) und schließlich mit etwas Wasser gewaschen. Die ätherische Lösung wurde über geglühtem Glaubersalz scharf getrocknet und nach dem Abdestillieren des Äthers auf dem Dampfbade der Rückstand der fraktionierten Destillation im Vakuum unterworfen. Bei 13 mm Druck siedet der Methyläthyloxalessigester zwischen 132 und 135°. Ausbeute: 400 g.

Die Umwandlung in Methyläthylbrenztraubensäure haben wir auch durch 20 stündiges Kochen des Methyläthyloxalessigesters mit der 10 fachen Menge 30 bis 35 $^0/_0$ iger Schwefelsäure versucht. Selbst bei dieser stärkeren Säure (Mebus verwendet 10 $^0/_0$ ige Schwefelsäure) ist die Hydrolyse nicht vollständig. Nach dem Erkalten trennt man im Scheidetrichter den als Öl aufschwimmenden unverseiften Anteil von der schwefelsauren Lösung der Methyläthylbrenztraubensäure und zieht letztere durch 10 malige Extraktion mit reichlichen Mengen Äther aus. Die ätherischen Lösungen werden über geglühtem Natriumsulfat getrocknet, abdestilliert und im Vakuum fraktioniert. Die reine Säure geht unter 11 mm Druck zwischen 70 bis 75° über; ein Teil sott jedoch erst gegen 80°. Die Säure erstarrt

---

[1]) Das Jodäthyl gibt immer etwas Jod ab.

manchmal von selbst, sonst im Frigo zu einer blätterigen, weißen Masse, die bei 30° wieder schmilzt.

Bei Verarbeitung von 213 g Methyläthyloxalessigester erhielten wir 40 g krystallisierte Methyläthylbrenztraubensäure, während 84 g unveränderten Methyläthyloxalessigesters zurückgewonnen wurden und von neuem hydrolysiert werden konnten.

2. Das Verhalten der Methyläthylbrenztraubensäure zu verschiedenen Hefen und zu Macerationssaft.

Eine 1%ige Lösung der Methyläthylbrenztraubensäure gerät mit den obergärigen Hefen M und XII und der untergärigen Hefe K in Gärung, allein die besten Resultate erhält man mit etwas schwächerer Säure, deren Konzentration zwischen 0,6 und 0,8% liegt.

Folgende Tabelle belehrt über das Verhalten. Außer der freien Säure ist auch ihr Kaliumsalz geprüft, das gleichfalls in Gärung gerät.

Tabelle.

	CO_2 nach		
	3 Std.	9 Std.	27 Std.
Hefe XII mit Methyläthylbrenztraubensäure . . .	2	7	9
„ „ „ dem Kaliumsalz	0,5	1,5	5
„ „ allein	0	0	0
Hefe M mit Methyläthylbrenztraubensäure . . .	2	5	6
„ „ „ dem Kaliumsalz	0,5	2	4,5
„ „ allein	0	0	0,5
Hefe K mit Methyläthylbrenztraubensäure . . .	5	6	6
„ „ „ dem Kaliumsalz	1,5	2,5	2,5
„ „ allein	0	0	Spur
Macerationssaft aus untergäriger Hefe[1] mit Methyläthylbrenztraubensäure . . .	0,75	3,5	5
do. allein	0	0	0

Aus der Übersicht geht hervor, daß Hefe K ein schnelleres Einsetzen der Gärung herbeiführt, während mit Hefe XII die Zerlegung den größten Umfang erreicht. Bei dem Kaliumsalz ist natürlich die Menge der entwickelten freien Kohlensäure geringer. Die in der Tabelle verzeichneten Versuche sind, wie üblich, in Schrötterschen Gärungsröhrchen angesetzt, die eine

[1]) Auch Macerationssaft aus obergäriger Hefe (siehe Neuberg und Czapski, diese Zeitschr. 67, 9, 1914) vergärt die Methyläthylbrenztraubensäure.

Kapazität von 10 ccm hatten. Auf 15 ccm der Säure, die hier 0,67 % ig war, bzw. auf 15 ccm des gleichfalls 0,67 % igen Kaliumsalzes wurde immer 1 g Hefe verwendet.

Auch mit Macerationssaft aus untergäriger Hefe geriet die Methyläthylbrenztraubensäure in Gärung. In Saft, der mit 0,7 % der Säure versetzt ist, entsteht eine starke Koagulation, trotzdem entwickeln sich beim Stehen im Brutschrank Kohlensäureblasen. Die zellfreie Gärung der Säure ist sehr deutlich, verläuft jedoch nicht so rapide wie die der Brenztraubensäure.

3. Gärungsversuche in größerem Umfange.

a) 150 g Hefe K wurden in 1500 ccm Leitungswasser von 40° aufgeschwemmt und mit 15 g reiner krystallisierter Methyläthylbrenztraubensäure versetzt. Nach dem Durchschütteln der Mischung nimmt man sehr schnell den Geruch nach Amylverbindungen und alsbald auch die Entwicklung von Kohlensäure wahr.

Das in einer 3-l-Flasche enthaltene Gemisch wurde unter Verschluß mit einem Wattebausch 48 Stunden im Brutschrank belassen. Alsdann wurde das Gärgut in einer kupfernen Destillierblase so lange mit Wasserdampf behandelt, bis 1500 ccm übergetrieben waren. Das Destillat wurde direkt 10 mal mit je 200 ccm Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Ätherextrakte in üblicher Weise über Glaubersalz getrocknet. Der gesamte Äther wurde hierauf am achtkugligen Birektifikator abdestilliert und der dickflüssige Rückstand nochmals 14 Stunden scharf über entwässertem Natriumsulfat getrocknet. Er wurde nunmehr aus einem kleinen Kölbchen der fraktionierten Destillation unterworfen. Bis 80° gingen Reste von Äther und etwas durch Selbstgärung der Hefe gebildeter Äthylalkohol über. Dann wurde eine Fraktion zwischen 81 bis 102°, eine solche von 103 bis 123°, eine solche von 124 bis 140°, eine Fraktion von 141 bis 160° und schließlich eine solche von 161 bis 180° erhalten. Die zwischen 81 bis 102° übergehende Menge belief sich auf 1,5 g, die zwischen 124 und 140° destillierte betrug 1 g. Letztere roch unverkennbar nach Amylalkohol. Die niedriger siedende ergab deutlich Aldehydreaktionen und roch auch nach Valeraldehyd.

Da die Mengen zur sicheren Identifizierung zu gering erschienen, wurden zwei neue Ansätze mit größeren Quantitäten angestellt.

b) 300 g Hefe XII wurden mit 3000 ccm Leitungswasser und 30 g reinster Methyläthylbrenztraubensäure gemischt und 2 Tage im Brutschrank belassen. Dann wurden abermals 150 g derselben Hefe hinzugefügt und 3 weitere Tage digeriert. Um noch unveränderte Methyläthylbrenztraubensäure zurückzuhalten, wurden dann 50 g Calciumcarbonat hinzugesetzt und durch 2 stündiges Schütteln mit dem Gärgut in möglichst innige Berührung gebracht. Alsdann wurde die weitere Verarbeitung genau wie bei Versuch a) vorgenommen, nur daß erstmalig 3 l mit Wasserdampf übergetrieben wurden. Die Hauptfraktion, die zwischen 124 bis 140^0 sott, betrug hier 4,55 g, während die Aldehydfraktion (85 bis 123^0) nur minimal war. (Bei der langen Dauer des Versuchs ist offenbar der Aldehyd weitgehend zu Amylalkohol reduziert gewesen.) Zwischen 170 bis 180^0 gingen 1,5 g eines stark sauer reagierenden Liquidums über. In den wenigen Tropfen, die zwischen 85 bis 123^0 destillierten, war ein Gehalt an Aldehyd durch den positiven Ausfall der Probe mit fuchsinschwefliger Säure und alkalisch-ammoniakalischer Silberlösung zu konstatieren.

c) Ferner wurde ein Versuch mit 2000 ccm Leitungswasser, 200 g Hefe XII und 10 g der krystallisierten Ketosäure angestellt. Nach 10 Minuten war die Entwicklung von CO_2 im Gange. Nach 24 Stunden wurden nochmals 100 g Hefe XII und zugleich auch noch 10 g Methyläthylbrenztraubensäure zugegeben, worauf die schwach gewordene Gärung wieder kräftig einsetzte. Nach 12 Stunden wurden wiederum 10 g Säure, aber keine Hefe mehr zugesetzt. Von diesem Zeitpunkte an wurde das Gärgut noch 2 Tage im Brutschrank belassen.

Nach gründlicher Durchmischung mit 70 g kohlensaurem Kalk und 2 stündiger Schüttelung auf der Maschine wurde in üblicher Weise destilliert. Die Verarbeitung und Fraktionierung ergaben 3,2 g Fraktion 80 bis 105^0, 4,0 g Anteil 106 bis 140^0, 0,5 g Substanz vom Siedepunkt 141 bis 160^0 und 3 g von 161 bis 180^0.

Für die weitere Verarbeitung wurde die Fraktion 106 bis 140^0 (4 g) des letzten Versuchs mit den Anteilen der Versuche a und b vereint, die zwischen 124 bis 140^0 übergegangen waren. Die langsame und sorgfältige Fraktionierung ergab 4,7 g einer Flüssigkeit, die zwischen 125,5 und 134^0 siedete. Sie roch

deutlich nach Amylalkohol und zeigte im Polarimeter im 2-dcm-Rohr eine Drehung von — 1,75°.

Zur weiteren Identifizierung der Substanz wurde die α-Naphthylisocyanatverbindung dargestellt, die fast in quantitativer Ausbeute entstand.

Die Analyse der Flüssigkeit selbst ergab:

0,1680 g Substanz: 0,4202 CO_2 und 0,2087 H_2O.
$C_5H_{11}.OH$. Ber.: C = 68,18, H = 13,64%;
gef.: C = 68,21; H = 13,80%.

Damit ist das Vorliegen von Amylalkohol außer Zweifel gestellt. Da reines aktives d-Methyläthylcarbincarbinol die spezifische Drehung von — 5,9° hat, enthält der durch die zuckerfreie Gärung gewonnene Alkohol rund 30% an aktiver Modifikation.

Wie erwähnt, weisen die bis 105° übergehenden Fraktionen einen Gehalt an Aldehyd auf, den qualitative Reaktionen zu erkennen gestatten. Aus sämtlichen vereinigten Anteilen gelang es, mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin ein Hydrazon zu gewinnen. Dasselbe schied sich zunächst ölig ab, erstarrte aber alsdann beim Reiben und Abkühlen zu einem öldurchtränkten Krystallkuchen, der abgepreßt und aus verdünntem Alkohol einmal unter Zugabe von Knochenkohle, dann für sich umkrystallisiert wurde. Erhalten wurden 0,68 g einer gelben, schön krystallisierten Verbindung, die bei 112 bis 113° schmolz und nach der Analyse das p-Nitrophenylhydrazon des Methyläthylacetaldehyds darstellte.

0,1521 g Substanz gaben 27,0 ccm N (754 mm, 30°).
$C_{11}H_{15}N_3O_2$. Ber.: N = 19,00%;
(mol 221) gef.: N = 19,11%.

Übrigens erwiesen sich diese Anteile bei der optischen Untersuchung als lävogyr; doch da nur durch Fällung mit p-Nitrophenylhydrazin daraus eine reine Verbindung abgeschieden werden konnte, war keine genaue Bestimmung der Drehung möglich.

Trotz der Behandlung mit Calciumcarbonat wurde zwischen 161 bis 180° in allen Fällen eine stark sauer reagierende Fraktion erhalten. Sie war auch in viel Wasser nicht klar löslich. Aus den vereinigten Fraktionen der 3 Versuche, die 5,6 g

wogen, wurde durch Kochen mit Ätzkalk und nachheriges Einleiten von Kohlendioxyd ein kristallisiertes Kalksalz gewonnen, das Calciumvalerinat zu sein schien. Allein die Analysen stimmten nur unscharf. Wir haben deshalb die konzentrierte Lösung des Calciumsalzes in Wasser fraktioniert mit starkem Silbernitrat gefällt (Niederschlag I u. II).

Die erste Fällung war nach dem Auswaschen erst mit 50%igem, dann mit absolutem Alkohol rein weiß und erwies sich durch die Analyse als ein valeriansaures Silber.

0,1264 g Substanz, in vacuo getrocknet, geben 0,0651 g Ag.

$C_5H_9O_2Ag$. Ber.: Ag = 51,67%;
gef.: Ag = 51,51%.

Durch genaue Zerlegung mit HCl wurde aus diesem Silbersalz eine Flüssigkeit erhalten, die alle Eigenschaften von Valeriansäure besaß. Sie drehte links.

Die zweite Fällung wies einen zu niedrigen Silbergehalt auf; außerdem verfärbte sich das Silbersalz beim Aufbewahren und namentlich schnell beim Erwärmen mit Wasser.

Die Linksdrehung der isolierten Valeriansäure zeigte, daß sie nicht etwa durch eine Zersetzung aus dem racemischen Ausgangsmaterial, sondern unter dem Einfluß biologischer Agenzien entstanden ist. Der Umstand, daß trotz Behandlung mit Calciumcarbonat die Valeriansäure sich verflüchtigt hat, findet offenbar darin seine Erklärung, daß zwar die starke Methyäthylbrenztraubensäure, nicht aber die schwache Fettsäure durch das kohlensaure Calcium neutralisiert worden ist.

Aus dem im theoretischen Teil angegebenen Grunde war die Untersuchung des unangegriffenen Teils der Methyläthylbrenztraubensäure von Wichtigkeit. Die Wiedergewinnung dieser Substanz führten wir in dem besonders glatt verlaufenden Versuch c) aus. Zu diesem Zweck wurden nach vollendeter Destillation der Satz von Hefe und Calciumsalzen abfiltriert und die schwach gelb gefärbte klare Lösung mit Schwefelsäure bis zur deutlichen Reaktion auf Kongo versetzt. Sie blieb zunächst klar und wurde 10 mal mit je 200 ccm Äther ausgeschüttelt. Dabei schied sich an der Grenzfläche allmählich ein Magma von Gipskrystallen ab, das die weitere Erschöpfung sehr erschwerte. Nach der üblichen Trocknung über entwässertem Natriumsulfat wurden die gesammelten

Ätherextrakte zunächst auf dem Dampfbade von der Hauptmasse des Äthers befreit, dann nochmals über wasserfreiem Glaubersalz stark getrocknet und nunmehr im Vakuum fraktioniert. Bei 10 mm gingen zwischen 78 bis 85° 2,9 g einer stark sauren, dicklichen Flüssigkeit über, die alle Eigenschaften von Methyläthylbrenztraubensäure hatte und stark lävogyr war. Die Linksdrehung der wasserfreien Substanz betrug im 1-dcm-Rohr — 2,32°.

Zum Beweise, daß Methyläthylbrenztraubensäure vorlag, wurde das Phenylhydrazon dargestellt, indem die wässerige Lösung von 1 g der Substanz mit Phenylhydrazinacetat in geringem Überschuß versetzt und schwach erwärmt wurde. Dabei verdichtete sich die anfängliche Trübung zu einem festen gelben Körper, der nach dem Stehen im Eisschrank abgesaugt und aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert wurde. Gelbweiße Nadeln vom Schmelzpunkt 132 bis 133°.

0,1792 g Substanz gaben 21,0 ccm CO_2 (28°, 768 mm).

$C_{12}H_{16}N_2O_2$. Ber.: N = 12,73 %;
gef.: N = 13,01 %.

Außer den genannten, uns in diesem Zusammenhange interessierenden Substanzen wurden noch die erwähnten unscharf siedenden Fraktionen und auch ein nicht unerheblicher Destillationsrückstand erhalten, aus dem keine einheitlichen Körper gewonnen werden konnten. Vermutlich liegen in ihnen Kondensationsprodukte des Valeraldehyds und der Methyläthylbrenztraubensäure vor.

Die Natur der isolierten Substanzen läßt keinen Zweifel an dem prinzipiellen Verlauf der Hefeeinwirkung auf Methyläthylbrenztraubensäure, die auf eine Amylalkoholgärung herauskommt.

Phytochemische Reduktionen. VII.

Die enzymatische Umwandlung des Thioacetaldehyds in Äthylmercaptan.

Von

C. Neuberg und F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Jüngst konnten wir zeigen[1], daß Thioacetaldehyd, $CH_3.CHS$, in Gegenwart einer gärenden Zuckerlösung zu Äthylmercaptan, $CH_3.CH_2SH$, reduziert wird. Dieser Vorgang, den wir mit lebender[2] Hefe verwirklicht hatten, bietet nach verschiedenen Richtungen hin Interesse.

Es liegt hier überhaupt der erste Fall vor, in dem Äthylmercaptan durch einen durchsichtigen phytochemischen Prozeß erzeugt wird, und dann stellt diese Reaktion den Thioaldehyd in Parallele mit den gewöhnlichen Aldehyden, die gleichfalls von Hefe zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden können.

Da die Aldehyde im Gegensatz zu den meisten anderen Gruppen mit besonderer Leichtigkeit durch Schwefelwasserstoff in die entsprechenden organischen Schwefelverbindungen übergeführt werden, kann man vielleicht diese Umwandlung mit der natürlichen Entstehung der in kleinen Mengen weit verbreiteten Schwefelverbindungen in Zusammenhang bringen.

Bei der Eigenart des ganzen Vorganges schien die Feststellung von Interesse, ob sich diese Reduktion des Thioacetaldehyds auch mit zellfreien Fermentlösungen aus Hefe, also als rein enzymatischer Prozeß, verwirklichen läßt.

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, Heft 12, 1914.

[2]) Abgetötete Hefe liefert auch in Gegenwart von Zucker keine Spur Äthylmercaptan.

Mit Hilfe des sogenannten Macerationssaftes aus untergäriger Hefe läßt sich in der Tat die Reduktion des Thioacetaldehyds zu Äthylmercaptan ausführen.

Wir verfuhren folgendermaßen:

Versuch 1.

In 1300 ccm Macerationssaft aus Trockenhefe nach v. Lebedew wurden 260 g Rohrzucker gelöst und nach Beginn einer deutlichen Gärung wurde eine Lösung von 10 g Thialdin [$(CH_3.CHS)_2.CH_3.CH:NH$] in 15 ccm warmen Alkohol hinzugesetzt. Das Thialdin geht leicht in Thioacetaldehyd über und kann zweckmäßig, wie wir früher[1]) auseinandergesetzt haben, als ein leicht lösliches Derivat des Thioacetaldehyds verwendet werden. Im Sinne der folgenden Formulierung kann es in ein Molekül Aldehydammoniak und zwei Moleküle Thioacetaldehyd zerfallen:

$$CH_3.CH\begin{matrix} .S.CH.CH_3 \\ \quad\quad >NH \\ S.CH.CH_3 \end{matrix} = 2\,CH_3.CHS + CH_3.CH:NH.$$

Der Zusatz des Thialdins ruft im Hefemacerationssaft die Bildung eines Niederschlages hervor und führt im Laufe der Digestion zu einer weitgehenden Koagulation. Die Anordnung der Versuche selbst entsprach ganz der von uns in den „Berichten" gegebenen Beschreibung.

Obgleich wir auch hier das Gärgefäß auf einer Temperatur von 40° hielten, setzte die Mercaptanbildung sehr viel langsamer ein. Während sie bei Verwendung von lebender Hefe in 5 bis 10 Minuten recht deutlich ist, beginnt sie bei Benutzung des Hefesaftes erst etwa nach $1^1/_2$ Stunden. Die Abgase der Gärung nahmen alsdann den unverkennbaren Mercaptangeruch an und erzeugen auf einem mit Nitroprussidnatrium plus alkalischer Bleilösung getränkten Filtrierpapierstreifen violette Zonen.

In einer vorgelegten Quecksilbercyanidlösung entsteht jetzt die charakteristische gelbliche Fällung des Mercuriäthylmercaptids; allein es mischt sich ihm bald eine reichliche Quantität von Quecksibersulfid bei.

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, Heft 12, 1914.

Die Bildung des Äthylmercaptans ist jedoch mit den früher von uns angeführten Reaktionen leicht erkennbar.

Versuch 2.

Bei der Wiederholung des Versuchs mit 2420 ccm Macerationssaft, 485 g Zucker und 20 g Thialdin, gelöst in 30 ccm Alkohol, gelang uns auch die Isolierung von reinem Bleiäthylmercaptid, $(C_2H_5.S)_2Pb$. Zu diesem Zwecke wurde der Versuch erst nach 5 Tagen, während denen die Gärung nicht aufhörte, unterbrochen. Ganz wie in den Versuchen mit lebender Hefe wurde zum Schluß unter Erwärmung das im Gärgefäß noch befindliche Mercaptan durch Kohlensäure in die Quecksilbercyanidvorlagen gedrückt. Die ausgeschiedenen braunen Niederschläge wurden auf einem Filter gesammelt und mit 600 ccm 5%iger Salzsäure destilliert. Die entweichenden Gase wurden in eine Vorlage mit 3%iger Bleiacetatlösung[1]) geleitet, in der sie die charakteristische citronengelbe Fällung von krystallisiertem Bleiäthylmercaptid hervorriefen.

Versuch 3.

Zu einem dritten Ansatz wurden 4080 ccm Macerationssaft, 800 ccm Rohrzucker und eine alkoholische Lösung von 30 g Thialdin in 42 ccm warmem Alkohol verwendet. Die Gärung zog sich 5 Tage lang hin. Die etwas abgeänderte[2]) Ver-

---

[1]) Da überschüssiges Bleiacetat Bleiäthylmercaptid löst, was M. Rubner (Arch. f. Hygiene **19**, 136, 1893) schon für die Methylverbindung angibt, haben wir die Menge der Bleilösung so bemessen, als ob 1/4 der möglichen Quantität Äthylmercaptan aus dem Thialdin hervorginge. Das ist noch ein Überschuß.

[2]) Die Abänderung der Methodik bestand in folgendem. Die Zerlegung des Quecksilbermercaptids durch 5%ige Salzsäure bleibt unvollständig. Eine stärkere HCl kann nicht verwendet werden, da diese einerseits aus HgS etwas Schwefelwasserstoff frei macht und andererseits selbst überdestilliert und in der Vorlage Chlorblei erzeugt. Diese Übelstände behebt man einigermaßen durch Benutzung von 10%iger Phosphorsäure. Die Destillation ist unter Nachfüllen von heißem Wasser aus einem Tropftrichter so lange fortzusetzen, als noch wolkige Trübungen von Bleimercaptid in der Vorlage erscheinen; letztere sind leicht zu erkennen, da sich das gelbe Salz beim Umschütteln schnell zu Boden setzt. Das Mercaptan geht nur langsam über und man muß 2 bis 3 mal das abdestillierte Wasser ergänzen.

arbeitung der Quecksilberniederschläge lieferte diesesmal 0,43 g Äthylmercaptidblei, dessen Reinheit durch die Analyse erwiesen werden konnte.

0,1086 g Substanz ergaben: 0,0998 g $PbSO_4$ (= 0,0682 g Pb).

$(C_2H_5.S)_2$ Pb. Ber. Pb. = 62,92%;

(329) gef. Pb. = 62,80%.

Mit dieser Bleiverbindung fielen alle Mercaptanproben höchst deutlich aus.

Die Reduktion des Thioacetaldehyds verlief in allen unseren Ansätzen mit Macerationssaft viel weniger energisch als mit lebender Hefe. Ganz ähnliche Erfahrungen haben C. Neuberg und H. Steenbock[1]) bei der Reduktion von Iso-Valeraldehyd mit zellfreiem Hefesaft gemacht. Offenbar ist letzterer weniger reich an reduzierenden Agenzien, und da so die Reduktion nur langsam verläuft, macht sich die von uns früher beschriebene unspezifische Zersetzung von Thialdin durch die Gärungskohlensäure so stark geltend, daß die Menge des entwickelten Schwefelwasserstoffs die des Mercaptans überwiegt.

Während Methylmercaptan, $CH_3.SH$, sicher bei einer Reihe bacterieller Prozesse aus schwefelhaltigen Stoffen als ein Produkt weitgehender Zersetzung gebildet wird, ist über ein natürliches Vorkommen von Äthylmercaptan, $C_2H_5.SH$, nichts bekannt.

Bei Rubner[2]) findet sich die Angabe, daß ein Zusatz von Schwefelblumen zu einer gärenden Zuckerlösung die Entstehung von Methyl- oder Äthylmercaptan neben Schwefelwasserstoff veranlasse; da es sich nur um eine Beimischung von Spuren Mercaptan zu dem H_2S handelt, war eine Entscheidung über seine Natur nicht möglich. M. Hahn[3]) konnte bei der Wiederholung des Versuchs mit Hefepreßsaft überhaupt kein Mercaptan, sondern lediglich Schwefelwasserstoff nachweisen. In geschwefelten Weinen soll nach L. Mathieu[4]) gelegentlich neben viel Schwefelwasserstoff Mercaptan vorkommen. Ein Beweis für diese Behauptung ist nicht erbracht. Auffallend ist auch die Angabe des Autors, daß Mercaptan erst einen Monat nach Ablauf der Hauptgärung im Moste auftrete! Da hier unzweifelhaft auch langsam verlaufende bakterielle Prozesse eingreifen, ist es mehr als unsicher, ob eine solche Mercaptanbildung mit der Hefengärung überhaupt etwas zu tun hätte. Ob Methyl- oder Äthylmercaptan vorgelegen haben soll, ist

---

[1]) C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. 59, 188, 1914.

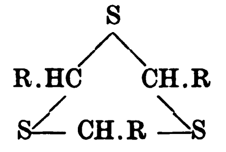
[2]) M. Rubner, Arch. f. Hygiene 19, 136, 1893.

[3]) Buchner-Hahn, Zymasegärung S. 343.

[4]) L. Mathieu, Bull. de l'Assoc. des Chim. de Sucrerie et de Destill. 28, 971, 1910/11.

nicht ersichtlich, und als einzige Begründung für eine Mercaptanbildung selbst wird nur der Geruch angeführt, der aber bei Anwesenheit von viel Schwefelwasserstoff sehr schwer zu beurteilen ist.

Wir benützen die Gelegenheit mitzuteilen, daß uns bisher eine Überführung der trimolekularen Thioaldehyde (Trithioformaldehyd, β-Trithioacetaldehyd) in die entsprechenden Mercaptane mit gärender lebender Hefe nicht gelungen ist. Die cyclische Konstitution der Trithioaldehyde



erschwert offenbar die Aufspaltung zur monomolekularen Form.

Über den Einfluß einiger biologisch wichtiger Säuren (Brenztraubensäure, Milchsäure, Äpfelsäure, Weinsäure) auf die Vergärung des Traubenzuckers.

Von

C. Neuberg und L. Czapski.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Freie Brenztraubensäure und mehrere ihrer Homologen geraten nach unseren Feststellungen leicht mit Hefe in Gärung. Allem Anschein nach vertragen die verschiedenen Hefesorten diese α-Ketosäuren besonders gut, so daß man eine natürliche Gewöhnung der Hefen an jene starken Säuren als an Stoffwechselprodukte annehmen könnte.

Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich zahlenmäßige Belege für eine relative Ungiftigkeit dieser und nahestehender Säuren finden ließen.

Außer mit Brenztraubensäure brachten wir die Hefen mit d,l-Milchsäure, l-Äpfelsäure und d-Weinsäure zusammen, die ja in vielen Früchten und Gärungsmaterialien vorkommen und so in der Natur mit Hefen in Berührung gelangen.

Der allgemeine Einfluß von Säuren auf die alkoholische Gärung ist mehrfach untersucht worden, so von M. Bial, Rosenblatt und Rozenband u. a. F. Johannessohn[1]) (hier die Literatur) prüfte den Verlauf der Hefegärung in Gegenwart von Ameisensäure und ihren höheren Homologen und fand, daß die gärungsaufhebende Konzentration des Anfangsgliedes der Reihe, der Ameisensäure, bei $^{n}/_{50}$, die der Essigsäure, Propionsäure,

[1]) F. Johannessohn, diese Zeitschr. **47**, 97, 1912.

der beiden Buttersäuren und Valeriansäure zwischen $^{n}/_{9,3}$ und $^{n}/_{12,5}$ liegt. Ferner führte Johannessohn aus, daß bei diesen Säuren „nicht die Ionen, sondern die nicht dissoziierten Moleküle die Hauptrolle“ bei der Gärungsbeeinflussung spielen.

Unsere Versuchsanordnung folgt ungefähr der von Johannessohn. 25 ccm $10^{0}/_{0}$iger Lösung reinen Traubenzuckers (Kahlbaum) wurden in 400 ccm fassende Flaschen gebracht und dazu so viel m-Säurelösung bzw. destilliertes Wasser hinzugefügt, daß die Gesamtkonzentration an Säure einen von $^{m}/_{2}$ bis 0 absteigenden Wert hatte. Nach nunmehrigem Zusatz von 1,5 g Hefe und kräftigem Umschütteln blieben die mit einem Wattepfropfen versehenen Flaschen genau 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, darauf kamen sie auf 4 Stunden in den Brutschrank. Die Gärung wurde dann möglichst schnell durch Zusatz von 3 g gepulvertem normalen Bleiacetat unterbrochen, und der Gefäßinhalt unter gründlichem Nachwaschen von Flasche und Filter in einen 150 ccm fassenden Meßkolben filtriert und bis zur Marke aufgefüllt. Eine Probe des gut durchgeschüttelten, meist etwas trüben Filtrats wurde durch ein wenig Kieselgur geklärt und polarisiert[1]). In den Tabellen sind die Zuckermengen in Prozenten der ursprünglich angewandten Quantität (2,5 g) angegeben.

Bedingung für einen Vergleich der zugesetzten Säuren in bezug auf Gärungshemmung ist, daß die Gärkraft der Hefen an den verschiedenen Tagen, an denen die Säuren geprüft wurden, unverändert blieb. Wir suchten gleiche Bedingungen dadurch zu schaffen, daß wir stets nur frische Reinzuchthefen verwendeten und außerdem als Kontrolle den Einfluß einiger Essigsäurekonzentrationen auf analoge Gärungsansätze untersuchten. Trotz der verschiedenen Tagestemperaturen während der Zeit der Untersuchungen blieb die Gärkraft, gemessen an der Essigsäurehemmung, ziemlich dieselbe; die Ergebnisse können daher untereinander verglichen werden.

Es wurden drei verschiedene Reinzuchthefen benutzt: eine untergärige (K), und zwei obergärige Rassen XII und M.

---

[1]) Die Werte wurden in einem noch $0{,}05^{0}/_{0}$ Traubenzucker genau anzeigenden Apparat, s. C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 102, 1914, abgelesen; die geringe Drehung der angewandten optisch-aktiven Säuren (l-Äpfelsäure, d-Weinsäure, Gärungsmilchsäure) konnte bei der herrschenden Verdünnung unberücksichtigt bleiben.

Gärungshemmung durch die Säuren.

I. Brenztraubensäure.

Vom angewendeten Traubenzucker wurden vergoren in Prozenten:

Säure	Hefe	Bei der Säurekonzentration									
		0	$^n/_{20}$	$^n/_{15}$	$^n/_{12}$	$^n/_{10}$	$^n/_{6,6}$	$^n/_5$	$^n/_{3,3}$	$^n/_{2,2}$	$^n/_2$
Brenz-traubensäure	XII	100	72	—	—	48	40	28	*0*	0	0
	M	100	64	—	—	28	24	*0*	0	0	0
	K	100	40	—	—	40	12	*0*	0	0	0
Essigs.-Kontrolle	XII	100	71	48	40	28	*0*	0	0		
	M	100	34	40	16	16	*0*	0	0		
	K	100	68	48	36	24	*0*	0	0		

Brenztraubensäure hemmte also die Zuckergärung völlig in 2 Fällen bei einer Konzentration von $^n/_5$, 1 mal bei einer Stärke von $^n/_{3,3}$.

Für die viel benutzte Rasse XII erwies sich die Brenztraubensäure also als halb so giftig wie die Essigsäure. Es sei jedoch bemerkt, daß eine $^m/_{3,3}$-$CH_3.CO.COOH$, d. i. eine 2,67 %ige Brenztraubensäure, unter den obwaltenden Bedingungen für sich, wenn auch nur zu einem kleinen Teil, vergoren wird. Demnach können diese Daten nicht ganz genau sein.

II. Milchsäure[1]).

Vom angewendeten Traubenzucker wurden vergoren in Prozenten:

Säure	Hefe	Bei der Säurekonzentration									
		0	$^n/_{20}$	$^n/_{15}$	$^n/_{12}$	$^n/_{10}$	$^n/_{6,6}$	$^n/_5$	$^n/_{3,3}$	$^n/_{2,2}$	$^n/_2$
Milch-säure	XII	100	100			76	56	40	40	28	*0*
	M	100	88			82	52	22	24	8	*0*
	K	100	100			76	56	40	40	28	*0*
Essigs.-Kontrolle	K	100	64	48	32	28	*0*	0	0		

Milchsäure unterbindet die Zuckergärung vollständig bei einer Konzentration von $^n/_2$. Im Vergleich zur Essigsäure hemmt sie nur sehr wenig; dies geht auch daraus hervor, daß die Milchsäure in Konzentrationen, bei denen die Essigsäure schon stark beeinträchtigt ($^n/_{20}$ bis $^n/_{10}$), die Hefen sehr unbedeutend schädigt.

[1]) Die angewandte Milchsäure war die Milchsäure des D. A. B. V. Sie enthielt nach unsrer Untersuchung 87,5 % Milchsäure; hiervon waren ca. 12 % in Lactidform zugegen; die Säure war ganz schwach lävogyr.

Praktisch wird diese Unempfindlichkeit der Hefen gegenüber Milchsäure schon lange verwertet; bei der Hefezüchtung und -führung wird bakteriell entstandene oder zugefügte Milchsäure als Antisepticum benutzt.

III. l-Äpfelsäure[1]).

Vom angewendeten Traubenzucker wurden vergoren in Prozenten:

Säure	Hefe	Bei der Säurekonzentration						
		0	m/10	m/6,6	m/5	m/3,3	m/2,2	m/2
Äpfelsäure	XII	100	68	64	60	32	32	28
	M	100	80	64	64	48	44	40
	K	100	56	36	36	8	*0*	0
Essigsäure-Kontrolle	XII		84	8	*0*	0		
	M		16	4	*0*	0		
	K		24	8	*0*	0		

Die Resultate bei der Äpfelsäure sind sehr merkwürdig. (Der Ansatz wurde zur Sicherheit mehrmals wiederholt; die Ergebnisse stimmten gut überein.) Während die obergärigen Rassen XII und M selbst bei Konzentrationen von n/2 nicht gänzlich und bei geringeren Konzentrationen nur wenig geschädigt werden, ist die untergärige Hefe K gegen l-Äpfelsäure viel empfindlicher. Die Gärung mit Hefe K wird zwar erst durch sehr viel mehr Äpfelsäure als Essigsäure gehemmt, aber die totale Aufhebung liegt dort, wo die zwei anderen Hefen noch 32 % bzw. 44 % der angewandten Zuckermenge umsetzen.

IV. d-Weinsäure.

Vom angewendeten Traubenzucker wurden vergoren in Prozenten:

Säure	Hefe	Bei der Säurekonzentration						
		0	m/10	m/6,6	m/5	m/3,3	m/2,2	m/2
Weinsäure	XII	100	32	28	28	12	0	0
	K	100	40	24	16	4	*0*	0
Essigsäure-Kontrolle	XII				16	*0*	0	
	K				8	*0*	0	

[1]) Da es bei der Wirkung der organischen Säuren auf die Hefen nicht auf die H-Ionen, mithin auch nicht auf die **Basizität** ankommt so wurden die Äpfelsäure und Weinsäure nicht in äquivalenten, sondern in **äquimolekularen** Konzentrationen angewandt.

Die d-Weinsäure hemmt die ober- und untergärige Hefe $^2/_3$ so stark wie die Essigsäure; die absolut hemmende Konzentration lag bei $^n/_{2,2}$, in der Essigsäure-Kontrolle bei $^n/_{3,3}$.

Der Umstand, daß die zum Vergleich benutzte Essigsäure eine gärungsaufhebende Wirkung auf unsere Hefen bei den Konzentrationen $^m/_{6,6}$ bis $^m/_{3,3}$ entfaltet[1]), zeigt, daß absolute Werte nicht zu erwarten sind. Immerhin bewegen sich die physiologischen Schwankungen in ziemlich engen Grenzen. Da stets die Gegenprobe mit Essigsäure vorgenommen worden ist, so halten wir den Schluß für berechtigt, daß die untersuchten vier Säuren die Gärung des Traubenzuckers unter den gegebenen Bedingungen weniger beeinträchtigen als die Essigsäure.

Um die sehr verschiedene Stärke der geprüften Säuren zu beleuchten, seien die Dissoziationskonstanten derselben hier angefügt:

Essigsäure . . . . $= 1,86 \cdot 10^{-5}$,
Weinsäure . . . . $= 9,7 \cdot 10^{-4}$,
Äpfelsäure . . . . $= 3,95 \cdot 10^{-4}$,
Milchsäure . . . . $= 1,38 \cdot 10^{-4}$,
Brenztraubensäure $= 5,6 \cdot 10^{-1}$.

---

[1]) Johannessohn (l. c.) erzielte Gärungshemmung schon mit ungefähr halb so starker Essigsäure; offenbar war seine Hefe (gewöhnliche Preßhefe des Handels) weniger widerstandsfähig als unsere ganz frischen und sehr gärkräftigen Reinkulturen.

Über die Triketohydrindenreaktion[1]).

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Farbenreaktion mit Triketohydrindenhydrat hat durch die Arbeiten der letzten Zeit ein Interesse gewonnen, das über den engeren Kreis der Chemiker hinausgeht.

Bis vor kurzem galt die Probe als eine Reaktion auf Aminosäuren oder Aminosäurenverbände. Es zeigte sich jedoch dann[2]), daß ein typischer Ausfall auch mit Körpern erhalten wird, die mit Aminosäuren nicht das geringste zu tun haben.

Aus einer Untersuchung an 49 Stoffen konnte ich folgende Gesetzmäßigkeit ableiten.

Eine positive Triketohydrindenreaktion geben:

1. Amine, namentlich in Verbindung mit schwachen Säuren, wie mit Essigsäure, Phosphorsäure, Borsäure, Kohlensäure u. dgl.; ebenso Oxyamine, wie Aminoäthylalkohol.

2. Aminoaldehyde, wie d-Glucosamin oder Aminoacetaldehyd, in freier Form oder besonders als Salz mit einer schwachen Säure.

3. Harnstoffderivate (Ureidoglucose, Allantoin).

4. Organische Aminosulfosäuren, wie Taurin.

5. Ammoniakverbindungen von Aldehyd- und Ketonsäuren.

6. Bestimmte organische Säuren, Dicarbonylverbindungen und Halogenaldehyde, die vorher mit Ammoniak in Berührung gewesen waren.

---

[1]) Mitgeteilt in der Sitzung der Berliner mikrobiolog. Gesellsch. vom 19. März 1914.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 56, 500, 1913.

Aus diesen Beobachtungen konnte ich den Schluß ziehen, daß für das Zustandekommen der typischen Reaktion nicht die Kombination einer Aminogruppe und eines Carboxylrestes erforderlich ist. Denn Amine, Aminoaldehyde und Taurin enthalten kein Carboxyl.

Von besonderem Interesse ist, daß eine minimale Fäulnis von Proteinen genügt, um eine Bildung von Substanzen mit stark positiver Triketohydrindenreaktion hervorzurufen. Es handelt sich dabei um Fäulnisbasen, die z. T. destillierbar sind.

Ferner hatte sich der bemerkenswerte Umstand ergeben, daß die Reaktion des Milieus von großer Bedeutung für das Gelingen der Probe ist. Genau wie bei Anstellung der Reaktion mit Aminosäuren ist möglichst Neutralität anzustreben. So kommt es, „daß die freien Amine oder ihre Chlorhydrate in einigen Fällen keine Reaktion geben, wohl aber die Salze [1]) dieser Amine mit schwachen Säuren, wie mit Essigsäure, Phosphorsäure oder Borsäure [2])".

Die Vieldeutigkeit der Probe haben dann E. Herzfeld [3]) sowie E. Deetjen und E. Fränkel [4]) bestätigt. Die letztgenannten Autoren schreiben dem positiven Ausfall der Probe mit d-Glucosamin eine besondere praktische Bedeutung zu. Eine solche darf man vielleicht auch einem weitverbreiteten Spaltungsprodukt der Phosphatide, dem Aminoäthylalkohol, beimessen.

Die früher angegebene Auswahl von Substanzen läßt ohne weiteres erkennen, daß man die Liste derselben noch wesentlich verlängern kann [5]).

Nur einige besonders typische Substanzen, die mit Triketohydrindenhydrat reagieren, sollen noch namhaft gemacht werden. Es sind dieses:

[1]) bereitet durch Neuralisation mit der Säure oder durch Umsetzung des Chlorids mit Natriumacetat, Natriumphosphat oder Borax.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **56**, 501, 1913.

[3]) E. Herzfeld, diese Zeitschr. **59**, 249, 1914.

[4]) H. Deetjen und E. Fränkel, Münchener med. Wochenschr. **1914**, S. 466.

[5]) Der Umstand, daß in wasserfreier oder stark alkalischer Lösung (W. Halle, E. Löwenstein und E. Přibram, diese Zeitschr. **55**, 357, 1913) Zuckerarten und mehrwertige Alkohole eine Färbung mit Triketohydrinden liefern, kann hier außer Berücksichtigung bleiben. Denn diese Verhältnisse spielen bei praktischer Anwendung der Probe keine Rolle, da ja stets möglichst neutrale Reaktion der wäßrigen Lösung gefordert wird.

A. Anorganische Verbindungen:

1. Thioschwefelsäure $H_2S_2O_3$, Sulfoxyarsensäure H_3AsO_3S, Selenige Säure H_2SeO_3, Schwefelwasserstoff H_2S, in Form der Ammoniakverbindungen. Dabei ist es gleichgültig, ob man von den reinen Ammoniumsalzen ausgeht oder von einem Gemische der Natriumsalze mit einem Ammonsalz (z. B. Natriumthiosulfat + Chlorammonium). Selbstverständlich muß man durch Zugabe von Borsäure, Phosphatgemisch oder dgl. die Reaktion im Bedarfsfalle „puffern".

2. Metalle, wie Magnesium, Zink, Aluminium (letzteres namentlich nach Ätzung mit Sublimat), Natriumamalgam (letzteres mit der äquivalenten Menge Essigsäure).

B. Organische Verbindungen:

Ameisensaures Ammonium, thiomilchsaures Ammonium, thioglycolsaures Ammonium, Chloralhydrat nach Zugabe von Ammoniak und Wegkochen des Überschusses.

Die Ausführung gestaltet sich z. B. folgendermaßen:

a) Man mischt 2 ccm Ammoniumchloridlösung (1 : 1000), also 0,002 g NH_4Cl, mit der Triketohydrindenlösung und fügt einen kleinen Magnesiumspan hinzu. Beim Erwärmen entwickelt sich lebhaft Wasserstoff. Nach etwa 1 Minute beginnt die Blaufärbung, die beim Stehen dann ganz enorm stark wird.

b) Man mischt 2 ccm $^n/_{10}$-Natriumthiosulfat mit 2 ccm $^n/_{10}$-Ammoniumchlorid und kocht mit Triketohydrindenhydrat 1 Minute lang. Es tritt typische Blauviolettfärbung ein.

c) 2 ccm einer $1\,^0/_0$igen Ammoniumformiatlösung geben beim Kochen mit dem Triketohydrindenreagens intensive Bläuung.

Die meisten der erwähnten Verbindungen wirken reduzierend, die Metalle durch die Wasserstoffentwicklung, und Thiosulfat, mit Borsäure reguliertes Ammoniumsulfid, Thiomilchsäure durch die Sulfhydrylgruppe, Selenit durch die Sauerstoffaufnahme usw. Wo ein Reduktionsvorgang bei möglichst neutraler Reaktion in Gegenwart von Ammoniumsalzen und von Triketohydrindenhydrat verwirklicht wird, scheint eine Reaktion leicht einzutreten. Es muß dahingestellt bleiben, ob es sich in allen Fällen um dieselbe[1]) gefärbte Verbindung handelt.

[1]) Vgl. S. Ruhemann, Transact. Chem. Soc. **99**, 797 und 1491, 1911.

Zur Biochemie der Strahlenwirkungen. II.

Über eigenartige Bildung von Acetaldehyd aus verschiedenen Säuren der aliphatischen Reihe durch photokatalytische Vorgänge.

Von

C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Beziehung des Acetaldehyds zu den Vorgängen bei der alkoholischen Gärung (Neuberg) und der Zusammenhang dieser Substanz mit den Acetonkörpern des tierischen Stoffwechsels [E. Friedmann[1]), G. Embden und M. Oppenheimer[2])] haben das Interesse für die Entstehung des Acetaldehyds durch Abbaureaktionen in besonderem Maße erregt.

Es ist nun bemerkenswert, daß ganz unerwarteterweise eine große und ausgesprochene Neigung zur Bildung dieser Substanz bei photokatalytischen Prozessen besteht. Acetaldehyd geht recht leicht aus einer ganzen Reihe von Substanzen hervor, die zunächst keinerlei Verwandtschaft mit diesem Aldehyd erkennen lassen.

Schon früher[3]) habe ich darauf hingewiesen, daß aus den ein- und mehrbasischen Säuren und Oxysäuren der aliphatischen Reihe unter der kombinierten Einwirkung von mineralischen Katalysatoren und von Licht in charakteristischer Weise Carbonylverbindungen gebildet werden, die meist in einer durchsichtigen Beziehung zu den Ausgangsmaterialien stehen und durch Oxydation aus diesen hervorgehen.

Unlängst haben nun Neuberg und Galambos[4]) be-

---

[1]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 202, 1908.

[2]) G. Embden und M. Oppenheimer, diese Zeitschr. **45**, 186, 1912.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, **27**, **29**.

[4]) C. Neuberg und A. Galambos, diese Zeitschr. **61**, 325, 1914.

merkt, daß bei der Belichtung von Weinsäure in Gegenwart bestimmter Anthracenabkömmlinge sich an der Luft schnell Acetaldehyd entwickelt.

Diese Beobachtung ist der Ausgangspunkt für die folgende Untersuchung gewesen.

Wie früher dargelegt wurde, ist der Reaktionsmechanismus der photodynamisch wirkenden Chromophoren dem der photokatalytisch wirkenden Metallsalze nahe verwandt, indem in beiden Fällen der abwechselnde Übergang einer höheren in die niedere Sauerstoffstufe und umgekehrt (Oxydul ⇆ Oxyd bei den Mineralsalzen, Leuko- oder Hydrochinonform ⇆ chinoide Form bei den Farbstoffen) die Grundlage der Photokatalyse bildet. Bei dieser Analogie war es zu erwarten, daß die photokatalytisch wirksamen Metallsalze in gleicher Weise Acetaldehyd erzeugen würden. Die diesbezüglichen Versuche haben die Richtigkeit der Voraussetzung im vollen Umfange bestätigt.

Geprüft wurden folgende Substanzen:

Propionsäure,
d, l-Glycerinsäure,
Bernsteinsäure,
Maleinsäure,
Fumarsäure,
d-Weinsäure,
α-Crotonsäure,
d, l-Serin,
d, l-Isoserin.

Höchst seltsamerweise lieferten alle diese Verbindungen bei Belichtung unter Luftzutritt in Gegenwart von Ferrosulfat, z. T. sehr schnell Acetaldehyd.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß je 2 g der betreffenden Säure in 200 ccm Wasser gelöst und mit 0,5 g reinem Ferrosulfat versetzt wurden. Bei den beiden Oxyaminosäuren der 3-Kohlenstoffreihe wurden noch einige Tropfen Schwefelsäure hinzugefügt.

Nach 24stündigem Stehen bei wolkenlosem Junihimmel läßt sich bereits das Auftreten von Acetaldehyd feststellen, wenn man von dem belichteten Gemisch etwa 15 ccm unter guter Eiskühlung abdestilliert. Dabei wurde in den Versuchen

mit flüchtigen Säuren (Propionsäure, α-Crotonsäure) nach beendeter Belichtung vor der Destillation überschüssiges kohlensaures Calcium hinzugefügt.

Das Destillat ergibt einen stark positiven Ausfall der Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Piperidin, reduziert gleichzeitig eine ammoniakalisch-alkalische Silberlösung (meist schon in der Kälte) und liefert eine intensive Rötung mit fuchsinschwefliger Säure. Bei mäßigen Lichtverhältnissen ist der Acetaldehyd erst in 3 bis 5 Tagen im Destillat der Ansätze nachweisbar. Man erhält ihn auch aus den löslichen Kalksalzen einiger der vorerwähnten Säuren, während bei Verwendung von Alkalisalzen das gleichzeitig gebildete Kalium- oder Natriumcarbonat[1]) zu einer Zerstörung bzw. Kondensation des entwickelten Aldehyds führt, erkenntlich an der gelben bis schwarzbraunen Verfärbung. Besonders kräftig ist die Acetaldehydbildung aus Bernsteinsäure und α-Crotonsäure.

Die Gemische wurden in Jenenser Erlenmeyerkolben auf dem Fensterbrett belichtet, wobei ein durch den Kork der Kolben führendes, abwärts gebogenes und ausgezogenes Glasrohr die notwendige[2]) Verbindung mit der atmosphärischen Luft herstellte.

Zu einer wesentlichen Anhäufung an Aldehyd kann es bei der erwähnten einfachen Versuchsanordnung nicht kommen, wenn man bedenkt, daß Acetaldehyd bei 21° siedet und in den besonnten Gefäßen die Temperatur bis über 40° stieg[3]). Die Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Piperidin ist nun so charakteristisch für den Acetaldehyd (soweit bekannt, tritt sie nur noch mit Propionaldehyd und Acrolein auf), daß an der Entstehung des Acetaldehyds kein Zweifel obwalten kann. Bei der α-Crotonsäure und bei der Bernsteinsäure ist der Acetaldehyd jedoch auch als p-Nitrophenylhydrazon abgeschieden

[1]) Vgl. C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 63, 1914.

[2]) Ohne Zutritt von Luft findet — jedenfalls in kürzerer Zeit — keine Bildung von Acetaldehyd statt. Bei 9monatlicher Besonnung einer 5%igen Bernsteinsäurelösung erhielten G. Ciamician und P. Silber (Ber. 47, 640, 1914) neben anderen Produkten auch etwas Acetaldehyd.

[3]) Nach H. v. Euler und E. Lindberg (diese Zeitschr. 39, 417, 1912) sowie A. Franke und E. Pollitzer (Ch. C. 13. II, 666) wird Acetaldehyd im Licht durch Kondensation auch weiter verändert.

worden. Zu diesem Zwecke wurde der Erlenmeyerkolben mit einer Vorlage verbunden, in der sich Natriumbisulfitlösung befand. Durch Destillation mit Natriumbicarbonat wurde aus dem Inhalt der Vorlage der Acetaldehyd abgeschieden und mit der Portion vereinigt, die durch direkte Destillation aus dem belichteten Gefäß übergetrieben werden konnte. Auf Zusatz der p-Nitrophenylhydrazinacetatlösung schieden sich die typischen eigelben Nadeln ab, deren Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren in beiden Fällen bei 128° lag.

Ganz ähnliche Resultate erhält man bei der Behandlung der vorerwähnten Säuren mit Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisensalzen[1]), so daß sich auch hier die wiederholt von mir betonte Analogie[2]) zwischen photokatalytischem Effekt und Hydroperoxydeinwirkung wieder zeigt. Es kann daher bezüglich der Entstehungsweise des Acetaldehyds durch Belichtung auf die Ausführungen verwiesen werden, die bei den Versuchen über die Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds gemacht worden sind[3]). Besonders hervorgehoben zu werden verdient der Umstand, daß diese Acetaldehydbildung sich mit gewöhnlichem Sonnenlicht und in Gefäßen, die für ultraviolette Strahlen nicht durchlässig sind, vollzieht.

Daraus erhellt die große Bedeutung des Katalysators (Eisensalzes); denn diese Säuren selbst sind nach A. Kailan[4]) sogar gegen das Licht einer Quecksilber-Quarzlampe beständig, wenn ihre reinen wässerigen Lösungen in Flaschen aus farblosem gewöhnlichem Glas bestrahlt werden.

Man kann wohl annehmen, daß auch unter natürlichen Verhältnissen, insbesondere in den Pflanzen, der zu allen möglichen Reaktionen und Kondensationen befähigte Acetaldehyd sich auf ähnlichen Wegen durch schnell verlaufende photokatalytische Vorgänge bilden kann.

---

[1]) Vgl. C. Neuberg und C. Tominaga, diese Zeitschr. 67, 71, 1914 und C. Neuberg und O. Rubin, ebenda 67, 77, 1914.

[2]) Vgl. C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 313, 1908.

[3]) Siehe diese Zeitschr. 67, 72 und 130, 1914.

[4]) A. Kailan, Monatsh. f. Chem. 34, 1209, 1913.

Zur Biochemie der Strahlenwirkungen. III.
Über die Bildung von Alkalicarbonat aus neutralen Salzen im Licht.

Von

C. Neuberg und W. H. Peterson.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Für die Existenz aller Lebewesen des Pflanzen- und des Tierreiches ist die Aufrechterhaltung einer bestimmten Reaktion ein unbedingtes Erfordernis. Bei den Stoffwechselvorgängen werden durch die Verbrennungen und Umlagerungen indifferenten kohlenstoffhaltigen Materials dauernd Säuren gebildet, zu deren Neutralisation die Organismen Basen benötigen. Zu diesem Zwecke stehen in den mit der Nahrung aufgenommenen Salzen geeignete Materialien zur Verfügung; aber ihr Vorrat erscheint oft gering im Verhältnis zu der Größe der Säureproduktion. Zur Bindung der Säuren wird von den Organismen auch das Ammoniak herangezogen; jedoch sein Verbrauch zu dem Zwecke der Neutralisation greift so einschneidend in den Stickstoffumsatz ein, daß nur unter bestimmten Verhältnissen eine derartige Verwendung möglich ist. Was an organischen Basen den Lebewesen zur Verfügung steht, ist an Menge meist unbeträchtlich.

Die Produktion organischer Säuren findet in ausgedehntem Maße bei Pflanzen statt; ihr Milieu weist häufig eine hohe H-Ionenkonzentration auf. Natürlich hält sich auch diese Säurebildung in bestimmten Grenzen. Man hat nun öfters beobachtet, daß bei besonders säurereichen Pflanzen die Acidität mit dem natürlichen Wechsel der Belichtung Änderungen zeigt, und zwar handelt es sich in der Regel um

eine Bildung von Säuren während der Nachtzeit und um ein Verschwinden dieser Säuren unter Tag.

Das Verständnis für diese Erscheinungen wird nun wesentlich erleichtert durch die Erkenntnis bestimmter chemischer Lichtreaktionen, der photokatalytischen Prozesse.

Während praktisch die in den Pflanzen vorkommenden Säuren keinerlei Lichtempfindlichkeit besitzen, erwerben sie eine solche in sehr ausgesprochener Weise, wenn sie in Gegenwart bestimmter mineralischer oder organischer Katalysatoren von den Sonnenstrahlen getroffen werden. Als solche Katalysatoren, welche die Lichtenergie übertragen, sind Eisen-, Mangan- und Uransalze einerseits, bestimmte organische Chromophore (Anthracenderivate) andererseits zu nennen.

Bringt man z. B. eine Milchsäurelösung in Gegenwart einer Spur Eisensalz in das Sonnenlicht, so entweicht Kohlensäure und es entsteht Acetaldehyd; dabei vermindert sich natürlich die Acidität. Ganz ähnlich ist der Abbau der Weinsäure, der Citronensäure, der Apfelsäure, der Bernsteinsäure und anderer organischer Säuren, wenn sie in Gegenwart des Katalysators und von Luft der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt sind. Stets erfolgt eine charakteristische Molekülverkleinerung unter Entbindung von Kohlensäure, wobei fast immer weniger saure Substanzen gebildet werden.

Solche Katalysatoren wirken nun in außerordentlich geringer Konzentration, und es ist beachtenswert, daß namentlich die Eisensalze, aber auch bestimmte Farbstoffe, in der Natur weit verbreitet sind und daher wohl imstande sein können, als derartige Regulatoren für die Konstanterhaltung des Milieus zu fungieren.

Wir haben nun gefunden, daß photokatalytische Prozesse nicht nur durch Fortnahme saurer Gruppen die Acidität einer Lösung herabsetzen können, sondern daß diese Vorgänge auch direkt zu einer Bildung von fixem Alkali führen.

Bei der Belichtung von Seignettesalzlösung in Gegenwart von anthrachinondisulfosaurem und dichloranthracendisulfosaurem Natrium hatten Neuberg und Galambos[1]) beobachtet,

---

[1]) C. Neuberg und A. Galambos, diese Zeitschr. 61, 315, 1914.

daß die zunächst neutral reagierende Mischung im Verlauf der Belichtung stark alkalisch wurde.

Diese Erscheinung haben wir nun näher verfolgt und sowohl den Einfluß anorganischer wie organischer Katalysatoren auf derartige Bildungen von Alkali studiert. Im Anschluß an die früheren Befunde von Neuberg verwendeten wir als Katalysatoren Eisensalze, Uransalze, Mangansalze sowie 2,7-Anthrachinondisulfosäure und 9,10-Dichloranthracen-2,7-disulfosäure. Mit sämtlichen der genannten Zusätze ist es nun möglich, die photokatalytische Bildung von Alkalicarbonat aus den neutralen Salzen der Apfelsäure, der Milchsäure, der Weinsäure, der Citronensäure und Bernsteinsäure zu erzielen.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß $1^0/_0$ige Lösungen der Alkalisalze jener vorerwähnten Säuren mit $0{,}1^0/_0$ des betreffenden Katalysators in Erlenmeyerkolben aus Jenenser Glas mehrere Tage belichtet wurden. Dabei machten die Gefäße jene Schwankungen mit, die durch die wechselnde Beleuchtung unter atmosphärischen Einflüssen bedingt werden. Die Jenenser Kolben waren mit durchbohrten Korkstopfen verschlossen, durch die ein abwärts gebogenes und mit feiner Spitze versehenes Rohr nach außen führte und die Kommunikation mit der Luft herstellte. Vor dem Beginn der Versuche wurde jedes Gefäß mit dem Inhalt durch Kochen sterilisiert. An einem aliquoten Teil der Lösungen wurde gleich zu Beginn des Versuches die saure bzw. alkalische Reaktion durch Titration mit $^1/_{10}$-Normallösung festgestellt. Eine weitere Titration nach erfolgter Belichtung zeigt die vollzogenen Veränderungen an. Ausnahmslos beobachteten wir den Eintritt alkalischer Reaktion bei Lackmus als Indicator. Sie stellt sich schon in den ersten Tagen ein und nimmt dann nur langsam zu. Diese Wirkungen kommen in gewöhnlichen Glasgefäßen und bei Tageslicht, also unter natürlichen Verhältnissen, zustande.

Wie man aus den Tabellen ersieht, handelt es sich um recht beträchtliche Bildungen von Alkali. Dasselbe ist als Carbonat bzw. Bicarbonat zugegen und verdankt seine Entstehung einem Zerfall der Alkalisalze, welcher der Spaltung der freien Säuren ganz analog ist. Die dem zerstörten Anteil der neutralen Salze entsprechende Basenmenge bleibt als Car-

bonat in Lösung. Folgende Formeln veranschaulichen den Vorgang:

$$\alpha)\ CH_3\cdot CHOH\cdot COONa + O = CH_3\cdot CHO + NaHCO_3,$$

$$\beta)\ \begin{array}{l} CHOH - COONa \\ | \\ CHOH - COOKa \end{array} + 2O = CHO\cdot CHO + H_2O + CO_2 + NaKCO_3.$$

Da bei anderen organischen Säuren ganz entsprechende Umwandlungen[1]) zu erwarten sind, darf es wohl als wahrscheinlich gelten, daß das Licht auch unter den natürlichen Verhältnissen in ähnlicher Weise als Regulator des Milieus zu wirken vermag.

Zu den Versuchen dienten in allen Fällen $1^0/_{00}$ige Lösungen der Katalysatoren in destilliertem Wasser.

Verwendet wurden Ferrosulfat, Ferrisulfat, Uranylsulfat, Mangansulfat, 2,7-anthrachinondisulfosaures Natrium und 9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaures Natrium. (Die festen Verbindungen wurden im Verhältnis 1:1000 gelöst.)

Zu je 100,0 ccm der Katalysatorlösung wurde 1 g des betr. Salzes (Kaliummalat, Kaliumsuccinat, Kaliumcitrat, Natriumlactat und Kalium-Natriumtartrat) gefügt und die Mischung aufgekocht. 50,0 ccm blieben im Dunkelzimmer, 50,0 ccm auf dem Fensterbrett stehen. Die Aufbewahrung erfolgte in den, wie beschrieben hergerichteten, Erlenmeyerkolben; die Versuchsanordnung verhindert in praxi die Verdunstung und die Infektion mit Keimen aus der Luft. Bei der gewählten Anordnung wurden die belichteten Gefäße höchstens 7 Stunden vom direkten Sonnenlicht getroffen.

Die Dunkelproben änderten sich auch äußerlich kaum, während sich die belichteten Lösungen alle mehr oder minder stark gelb bis braun färbten und öfter einen Niederschlag absetzten. Sie erlangten dabei schnell die Fähigkeit, ammoniakalisch-alkalische Silberlösung und zumeist auch Fehlingsche Mischung intensiv zu reduzieren (vgl. die früheren Untersuchungen von Neuberg über die Reaktionsprodukte dieser Photokatalysen).

---

[1]) Über den Bernsteinsäureabbau im Licht s. S. 59.

Zu Beginn der Versuche und nach den in den Tabellen verzeichneten Zeiten wurden nach kräftigem Durchschütteln — es destilliert bei der Besonnung etwas Wasser in den Kolbenhals — jedesmal 5 ccm herauspipettiert und titriert. Je nach der Art der Salze und der Katalysatoren bestand neutrale, saure oder alkalische Reaktion.

Der Anfangstiter änderte sich in den Dunkelproben nicht oder unbedeutend. In den belichteten Gefäßen fanden beträchtliche Veränderungen statt, stets im Sinne einer Alkalibildung. Die Titrationen geschahen mit $^{n}/_{10}$-Lösungen und mit Lackmus als Indicator. Bis auf die Versuchsreihen mit Kaliumsuccinat plus Uran- bzw. den Eisensulfaten sind die Umschläge deutlich; in den letztgenannten Fällen ist die Endreaktion nicht sehr scharf, da hier die ziemlich starken Ausfällungen im Lichte die Titration erschweren.

Zum Schlusse wurden Hell- und Dunkelproben titriert. Die Differenz gibt den Alkalizuwachs an. Er ist wohl in einzelnen Fällen noch etwas höher zu veranschlagen, da ein Teil des gebildeten Carbonats durch Umsetzung mit dem Katalysator sich der Titration entzieht, indem „Neutralsalze" entstehen, z. B.

$$Fe_2(SO_4)_3 + 3 Na_2CO_3 + 3 H_2O = 3 Na_2SO_4 + 2 Fe(OH)_3 + 3 CO_2 .$$

Hervorgehoben zu werden verdient der Umstand, daß die Alkalibildung bald einen beträchtlichen Umfang erreicht, der dann nicht mehr erheblich zunimmt. Zum Teil hängt dieses Verhalten mit Veränderungen und Ausfällungen der Katalysatoren zusammen.

Die absolute Menge des gebildeten Alkalis schwankt, erreicht aber erhebliche Höhen. Die stärkste von uns beobachtete Umwandlung (Kalium-Natriumtartrat + Anthrachinondisulfosäure, s. Tabelle V) ergibt fast 63% der theoretisch möglichen Quantität Alkali[1]).

---

[1]) In diesem Versuche benötigen 5,0 ccm der belichteten Lösung zur Neutralisation 3,0 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4. Für 100 ccm, die 1 g Seignettesalz (wasserfrei) enthielten, macht das 60 ccm $^{n}/_{10}$-Säure aus. Da 210 g Kalium-Natriumtartrat 20000 ccm $^{n}/_{10}$-Säure äquivalent oder 1 g = 95,2 ccm $^{n}/_{10}$-Säure sind, so entspricht die gefundene Alkalität von 60 ccm rund 63% der Theorie.

I. Versuche mit Ferrisulfat.

	In 100 ccm 1°/₀₀igem Ferrisulfat waren gelöst je 1,0 g		An n/10-Lösung[1]) verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm n/10-Säure
			zu Anfang	nach 4 Tagen	nach 15 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,3 (NaOH)	1,6	1,6	1,8
		Dunkelprobe . .	0,3 (NaOH)	—	0,2 (NaOH)	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	0,4 (NaOH)	0,0	0,2	0,2
		Dunkelprobe . .	0,4 (NaOH)	—	0,0	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	0,7	1,6	2,7	1,9
		Dunkelprobe . .	0,7	—	0,8	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,6 (NaOH)	0,1 (NaOH)	0,2	0,7
		Dunkelprobe . .	0,6 (NaOH)	—	0,5 (NaOH)	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,3 (NaOH)	0,8	1,0	1,2
		Dunkelprobe . .	0,3 (NaOH)	—	0,2 (NaOH)	

II. Versuche mit Ferrisulfat.

	In 100 ccm 1°/₀₀igem Ferrisulfat waren gelöst je 1,0 g		An n/10-Lösung verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm n/10-Säure
			zu Anfang	nach 8 Tagen	nach 18 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,4	1,8	2,0	1,6
		Dunkelprobe . .	0,4	—	0,4	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	0,45 (NaOH)	0,1 (NaOH)	0,1	0,4
		Dunkelprobe . .	0,45 (NaOH)	—	0,3 (NaOH)	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	1,3	2,4	2,4	1,1
		Dunkelprobe . .	1,3	—	1,3	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,5 (NaOH)	0,2	0,3	0,8
		Dunkelprobe . .	0,5 (NaOH)	—	0,5 (NaOH)	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,05	1,0	1,2	1,15
		Dunkelprobe . .	0,05	—	0,05	

[1]) Hier wie in den folgenden Tabellen bedeuten die Zahlen die zur Neutralisation verbrauchten Kubikzentimeter n/10-H_2SO_4. War die Anfangsreaktion sauer, so ist die zur Neutralisation benötigte Menge n/10-NaOH durch die Bezeichnung (NaOH) hinter der Zahl gekennzeichnet.

III. Versuche mit Manganosulfat.

	In 100 ccm 1‰igem Manganosulfat waren gelöst je 1,0 g		An $^{n}/_{10}$-Lösung verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm $^{n}/_{10}$-Säure
			zu Anfang	nach 4 Tagen	nach 17 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,3 (NaOH)	1,6	1,6	1,8
		Dunkelprobe . .	0,3 (NaOH)	—	0,2 (NaOH)	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	0,4 (NaOH)	0,0	0,2	0,2
		Dunkelprobe . .	0,4 (NaOH)	—	0,0	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	0,75	1,6	2,7	1,9
		Dunkelprobe . .	0,75	—	0,8	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,65 (NaOH)	0,1 (NaOH)	0,2	0,75
		Dunkelprobe . .	0,65 (NaOH)	—	0,55 (NaOH)	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,3 (NaOH)	0,8	1,0	1,2
		Dunkelprobe . .	0,3 (NaOH)	—	0,2 (NaOH)	

IV. Versuche mit Uranylsulfat.

	In 100 ccm 1‰igem Uranylsulfat waren gelöst je 1,0 g		An $^{n}/_{10}$-Lösung verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm $^{n}/_{10}$-Säure
			zu Anfang	nach 8 Tagen	nach 17 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,4	1,9	2,3	1,85
		Dunkelprobe . .	0,4	—	0,45	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	1,2	1,2	1,2	0,0
		Dunkelprobe . .	1,2	—	1,2	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	1,3	1,9	2,2	0,9
		Dunkelprobe . .	1,3	—	1,3	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,2 (NaOH)	0,9	1,2	1,4
		Dunkelprobe . .	0,2 (NaOH)	—	0,2 (NaOH)	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,05	1,2	1,4	1,3
		Dunkelprobe . .	0,05	—	0,1	

V. Versuche mit 2,7-anthrachinondisulfosaurem Natrium.

	In 100 ccm 1 ‰ anthrachinon-disulfosaurem Natrium waren gelöst je 1,0 g		An $^{n}/_{10}$-Lösung verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm $^{n}/_{10}$-Säure
			zu Anfang	nach 5 Tagen	nach 13 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,6	2,8	3,4	2,6
		Dunkelprobe . .	0,6	—	0,8	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	1,3	1,5	3,0	1,7
		Dunkelprobe . .	1,3	—	1,3	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	1,2	3,3	3,8	2,4
		Dunkelprobe . .	1,2	—	1,4	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,0	1,5	2,2	2,15
		Dunkelprobe . .	0,0	—	0,05	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,2	2,8	3,2	3,0
		Dunkelprobe . .	0,2	—	0,2	

VI. Versuche mit 9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaurem Natrium.

	In 100 ccm 1 ‰ igem dichlor-anthracen-disulfosaurem Natrium waren gelöst je 1,0 g		An $^{n}/_{10}$-Lösung verbrauchten je 5,0 ccm dieser Mischung zur Neutralisation			Pro 5 ccm gebildetes Alkali, ausgedrückt in ccm $^{n}/_{10}$-Säure
			zu Anfang	nach 5 Tagen	nach 13 Tagen	
1	Äpfelsaures Kalium	belichtete Probe	0,6	2,2	3,0	2,3
		Dunkelprobe . .	0,6	—	0,7	
2	Bernsteinsaures Kalium	belichtete Probe	1,4	2,4	2,6	1,2
		Dunkelprobe . .	1,4	—	1,4	
3	Citronensaures Kalium	belichtete Probe	1,5	2,1	3,0	1,5
		Dunkelprobe . .	1,5	—	1,5	
4	Milchsaures Natrium	belichtete Probe	0,05 (NaOH)	0,9	2,0	1,95
		Dunkelprobe . .	0,05 (NaOH)	—	0,05 (NaOH)	
5	Weinsaures Kalium-Natrium	belichtete Probe	0,1	1,7	3,1	2,7
		Dunkelprobe . .	0,1	—	0,4	

Über den Abbau der Bernsteinsäure und der α-Crotonsäure zu Acetaldehyd.

Von

C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Der Ab- und Umbau der einfachen aliphatischen Säuren im tierischen und pflanzlichen Organismus ist noch nach manchen Richtungen hin unbekannt. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß ein Teil dieser Substanzen auf oxydativem Wege von den Organismen verarbeitet wird. Dabei bieten dem Verständnis besonders die Umsetzungen solcher Säuren Schwierigkeiten, die für chemische Begriffe schwer oder kaum angreifbar erscheinen.

Ein Beispiel der letztgenannten Art ist die Bernsteinsäure, $COOH—CH_2—CH_2—COOH$, die unzersetzt aus rauchender Salpetersäure umkristallisiert werden kann und das Endprodukt[1]) der Oxydation zahlreicher aliphatischer und cyklischer Substanzen in vitro darstellt, während sie nach den Feststellungen von F. Battelli und L. Stern[2]) durch die Oxydasen des Tierkörpers mit großer Leichtigkeit oxydiert wird. Das Umwandlungsprodukt, das die Autoren als Äpfelsäure, $COOH—CH_2—CHOH—COOH$, bezeichnet hatten, ist nach H. Einbeck[3]) Fumarsäure, $COOH—CH:CH—COOH$. Auf alle Fälle handelt es sich um eine höchst eigenartige Oxydation der so schwer angreifbaren Bernsteinsäure.

Bei der Fahndung auf ähnlich wirkende, rein chemische Reaktionen wurde auch das Gemisch von Hydroperoxyd und

---

[1]) Siehe Victor Mayer-Jacobson, **1**, II, 257

[2]) F. Battelli und L. Stern, diese Zeitschr. **30**, 177, 1910.

[3]) H. Einbeck, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 145, 1913; **90**, 301, 1914.

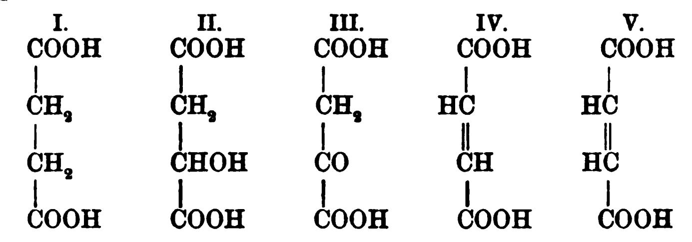
Eisensalz benutzt, dessen Effekt vielfach dem Verlaufe biochemischer Oxydationen entspricht.

In der Tat greift Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisensalz Bernsteinsäure mit großer Leichtigkeit und Heftigkeit an. Es entsteht zwar nicht Äpfelsäure oder Fumarsäure, sondern höchst auffallenderweise Acetaldehyd, CH_3—CHO, und zwar in großen Mengen[1]).

Man erhält bis 7,7 % vom Gewichte der angewandten Bernsteinsäure an Acetaldehyd; da man annehmen darf (s. u.), daß 1 Mol. Bernsteinsäure 1 Mol. Acetaldehyd liefert, so konnten wir bis zu $^1/_5$ der angewandten Bernsteinsäure in Aldehyd überführen.

Vom Verlauf der Oxydation kann man sich folgende Vorstellung machen.

Das Oxydationsmittel führt die Bernsteinsäure (I) zunächst in Äpfelsäure (II) über, die dann in bekannter Art in Acetaldehyd und Kohlensäure bzw. Ameisensäure übergeht. Nachweislich entstehen bei der Reaktion Kohlensäure, Ameisensäure und Essigsäure neben dem Acetaldehyd. Man kann auch eine Oxydation zu Ketobernsteinsäure, das ist Oxalessigsäure (III), annehmen, die leicht in Acetaldehyd und CO_2 zerfällt. Will man als erstes Oxydationsprodukt der Bernsteinsäure die Fumarsäure (IV) oder Maleinsäure (V) annehmen, so steht auch dieser Deutung nichts im Wege, da Fumarsäure und Maleinsäure unter den gleichen Bedingungen durch Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz in Acetaldehyd übergeführt werden[2]).



Durch die beschriebene einfache Reaktion ist die Bernstein-

[1]) Die ersten Versuche hierüber hat im Jahre 1912 Herr Dr. Groh ausgeführt; darüber habe ich kurz in der Sitzung der Berliner physiolog. Ges. vom 19. Dez. 1913 berichtet.

[2]) Siehe C. Neuberg und O. Rubin, diese Zeitschr. 67, 77, 1914.

säure zu einem außerordentlich reaktionsfähigen Produkt, dem Acetaldehyd, in eine nicht vorherzusehende Verwandtschaft gesetzt worden, und da durch Belichtung an der Luft die gleiche Umwandlung zustande kommt[1]), so darf diese Beziehung auch in biochemischer Hinsicht ein Interesse in Anspruch nehmen. Dieses besteht darin, daß so die Bernsteinsäure und ihre Abkömmlinge mit der Gruppe der Acetonkörper verknüpft werden, da ja nach einer von C. Neuberg und F. Blumenthal[2]) beiläufig ausgesprochenen Annahme und nach von E. Friedmann[3]) gelieferten Beweisen der Acetaldehyd über das Aldol mit der β-Oxybuttersäure zusammenhängt.

Dieser letzte Gesichtspunkt hat uns veranlaßt, eine andere Säure, die zur Gruppe der Acetonkörper in näherer Beziehung steht, die α-Crotonsäure, $CH_3.CH:CH.COOH$, auf ihr Verhalten zu dem gleichen Oxydationsgemisch zu untersuchen. Auch die α-Crotonsäure fanden wir befähigt, bei der Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz leicht und reichlich Acetaldehyd zu liefern; ca. 9,5 % vom Gewichte der Säure oder 18,5 % der Theorie konnten wir als Aldehyd isolieren.

Der Übergang der α-Crotonsäure in Acetaldehyd ist wohl so zu deuten, daß eine Spaltung in Acetaldehyd und ein Derivat der Essigsäure stattfindet, also in gewissem Sinne eine Reaktion, die der bekannten Bildung von Crotonsäure aus Acetaldehyd und Essigsäureabkömmlingen entgegengesetzt ist. Es sei darauf hingewiesen, daß sich der Übergang von α-Crotonsäure in Acetaldehyd auch unter dem Einfluß des Lichtes vollzieht[1]).

Experimenteller Teil.

Bearbeitet von C. Tominaga.

A. Überführung von Bernsteinsäure in Acetaldehyd.

1.

6 g reinste Bernsteinsäure werden mit 50 ccm Wasser übergossen und mit 110 ccm 2 %igem Wasserstoffsuperoxyd und 0,5 g Ferrosulfat versetzt. Beim Erwärmen erfolgte klare Lö-

---

[1]) Siehe C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 59, 1914.

[2]) C. Neuberg und F. Blumenthal, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 241, 1902.

[3]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 202, 1908.

sung und die Flüssigkeit färbte sich zunächst rotbraun. Unter stürmischer Reaktion, während welcher man die Flamme am besten entfernt, entwickelte sich Gas, und es destillierte Acetaldehyd über, der durch einen Energiekühler in eine eisgekühlte Vorlage geführt wird. Man erwärmt alsdann, bis die Flüssigkeit wieder hellgelb geworden ist. Das Destillat, dessen Menge etwa 50 ccm beträgt, gibt auf das intensivste die Probe auf Acetaldehyd nach Rimini, sowie die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure sowie mit ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung. Durch Fällung mit einer klar filtrierten essigsauren Lösung von p-Nitrophenylhydrazin entsteht sofort ein reichlicher Niederschlag des gelben Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons. Seine Menge betrug nach dem Absaugen und Umkrystallisieren 0,23 g = 0,06 g Acetaldehyd[1]).

Da mehr als die Hälfte der angewandten Bernsteinsäure durch Ätherextraktion unverändert aus der Lösung zurückgewonnen werden konnte, so haben wir in den weiteren Versuchen die Menge des Wasserstoffsuperoxyds vermehrt.

Wir verfuhren folgendermaßen:

2.

Die Destillation des Gemisches von 6 g Bernsteinsäure, 50 ccm Wasser, 0,5 g Ferrosulfat und 110 ccm Wasserstoffsuperoxyd wurde genau wie bei Versuch 1 vorgenommen. Nach der Beendigung wurden durch einen Tropftrichter in den Destillationskolben 110 ccm Wasserstoffsuperoxyd und gleichzeitig eine konzentrierte wäßrige Lösung von 0,5 g Ferrosulfat hinzugesetzt. Es fand abermals eine heftige Reaktion statt, nach deren Ablauf sich die braune Flüssigkeit wieder hell färbte. Diese Prozedur wurde noch dreimal wiederholt, so daß im ganzen 5 Destillationen mit 550 ccm Wasserstoffsuperoxyd ausgeführt wurden. Da sich allmählich ein Bodensatz unlöslicher Eisenverbindungen abschied, so wurden mit dem Wasserstoffsuperoxyd zusammen mehrmals einige ccm 20%iger Schwefelsäure hinzugegeben. Dieses Mal konnten aus dem Destillat 1,33 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon isoliert werden, entsprechend 0,33 g Acetaldehyd oder 5,5% vom Gewicht der angewandten Bernsteinsäure.

[1]) 179 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon = 44 g Acetaldehyd.

3.

Um eine bessere Ausbeute zu erzielen, wurden in einem anderen Versuch 6 g Bernsteinsäure mit 80 ccm Wasser, 0,5 g Ferrosulfat, aber nur mit 30 ccm Wasserstoffsuperoxyd destilliert. Durch 33 malige (!) Ausführung der Destillation unter einem Gesamtverbrauch von 990 ccm Hydroperoxyd und mit mehrfacher Zugabe von Ferrosulfatlösung, sowie etwas verdünnter Schwefelsäure wurden 1060 ccm übergetrieben. Der Gehalt des Destillats an Acetaldehyd wurde hier durch Titration mit Bisulfit nach Ripper gemäß der ausgezeichneten Vorschrift von O. von Fürth[1]) ausgeführt. Es wurden 0,4604 g Acetaldehyd ermittelt = 7,7 % vom Gewicht der Bernsteinsäure. Unter der wohl begründeten Annahme, daß 1 Mol. Acetaldehyd aus 1 Mol. Bernsteinsäure entsteht, entspricht die erhaltene Menge Aldehyd einem Verbrauch von 1,234 g Bernsteinsäure gleich 20,6 % der eingewogenen Quantität.

Außer durch die beschriebenen Reaktionen haben wir das Vorliegen von Acetaldehyd durch die Analyse des p-Nitrophenylhydrazons nachgewiesen. Die in prächtigen gelben Nadeln krystallisierte Verbindung war schon bei der Abscheidung fast rein, indem sie bei 125° schmolz.

0,1635 g Substanz: 34,7 ccm N bei 24° und 750 mm.

$C_8H_9N_3O_2$: ber.: 23,46 % N; gef.: 23,47 % N.

B. Die Überführung der α-Crotonsäure in Acetaldehyd bewerkstelligten wir folgendermaßen.

1.

4,3 g α-Crotonsäure wurden mit 50 ccm Wasser übergossen und mit 0,5 g festem Ferrosulfat, sowie 120 ccm Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Die Reaktion verlief beim Erwärmen, ähnlich wie bei der Bernsteinsäure, unter heftigem Aufwallen. Es wurden noch 5 mal 120 ccm Wasserstoffsuperoxyd und kleine Mengen Eisensulfatlösung durch den Tropftrichter in den Destillationskolben nachgefüllt. Die 5 Destillationen ergaben 450 ccm Destillat, in dem titrimetrisch nach Ripper-v. Fürth 0,3408 g Acetaldehyd nachgewiesen wurden; das sind 15,5 % der Theorie.

---

[1]) O. v. Fürth und D. Charnass, diese Zeitschr. 26, 207, 1910.

Der nicht verbrauchte Teil des Destillats (308 ccm) ergab 0,76 g reines Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon[1]).

2.

In einem anderen Versuch gingen wir von 4,3 g α-Crotonsäure aus, die in der angegebenen Weise 25 mal mit je 30 ccm, also 750 ccm H_2O_2 destilliert wurden. Das Destillat, dessen Gesamtmenge 950 ccm betrug, wurde unter guter Eiskühlung noch einmal destilliert und auf 200 ccm gebracht. Durch Fällung mit einer Lösung von essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin entstand ein dicker Brei gelber Krystallnadeln, deren Menge sich nach dem Absaugen und Reinigen durch zweimaliges Umkrystallisieren[1]) aus verdünntem Alkohol auf 1,65 g belief. Das entspricht 18,6 % der Theorie an Acetaldehyd.

Auch hier wurde der gewonnene Acetaldehyd durch die Analyse seines p-Nitrophenylhydrazons charakterisiert.

0,1198 g Substanz: 25,8 ccm N bei 753 mm und 27°,

$C_8H_9N_3O_2$: ber.: 23,46 % N; gef.: 23,53 % N.

Die experimentellen Daten zeigen, daß die Überführung der Bernsteinsäure wie der α-Crotonsäure in Acetaldehyd[2]) leicht und verhältnismäßig glatt bewerkstelligt werden kann.

---

[1]) Das rohe p-Nitrophenylhydrazon muß zweimal aus dünnem Sprit umkrystallisiert werden, da ihm eine kleine Menge einer schwerlöslichen scharlachroten Verbindung beigemengt ist.

[2]) Die beschriebene Art der Bildung von Acetaldehyd ist offenbar durchaus verschieden von seiner Entstehung bei der Permanganatoxydation der Äthoxy- und Äthylimidgruppen, die L. Rosenthaler (Chem. Centralbl. 14, I, 956) aufgefunden hat; bei ihr handelt es sich um eine Oxydation primär vorgebildeter $CH_3.CHO$-Reste.

Umwandlung von Fumarsäure, Maleinsäure, Glycerinsäure und Weinsäure in Acetaldehyd.

Von

Carl Neuberg und Olga Rubin.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Durch eine Anzahl merkwürdiger Reaktionen geht Acetaldehyd aus verschiedenen Verbindungen hervor, die kaum eine Beziehung zu dieser Substanz erwarten lassen konnten.

Bei der Einwirkung des Lichtes[1]), bei der Desaminierung durch salpetrige Säure[2]) und bei der Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd[3]) konnte die Entstehung des Acetaldehyds aus den verschiedenen Substanzen der 2-, 3- und 4-Kohlenstoffreihe nachgewiesen werden, die keinerlei genetischen Zusammenhang mit dem Acetaldehyd besitzen.

Durch die Überführung dieser Verbindungen in Acetaldehyd eröffnen sich auch neue Möglichkeiten für den physiologischen Abbau der Ausgangsmaterialien, so daß aus diesem Grunde eine Erweiterung unserer Kenntnisse solcher Acetaldehydbildungen wünschenswert erscheint.

Wir berichten im folgenden über die sehr eigenartige Entstehung des Acetaldehyds aus Fumarsäure, Maleinsäure, Glycerinsäure und Weinsäure.

Bezüglich des Verlaufs der Reaktion bei den beiden zuerst genannten Substanzen verweisen wir auf die Darlegungen von C. Neuberg[3]) über den Abbau der Bernsteinsäure zu Acet-

---

[1]) C. Neuberg, Diese Zeitschr. 61, 325, 1914; 67, 59, 1914.
[2]) C. Neuberg u. B. Rewald, diese Zeitschr. 67, 127, 1914.
[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 71, 1914.

aldehyd. Bei der Glycerinsäure und bei der Weinsäure möchten wir uns vorläufig nur auf die Konstatierung der Tatsache beschränken.

Soviel steht fest, daß der Acetaldehyd als ein besonders häufiges und charakteristisches Abbauprodukt komplizierterer organischer Substanzen bei gelinden Eingriffen auftritt[1]).

Experimentelles.

1.

5,8 g Fumarsäure wurden mit 30 ccm Wasser übergossen und mit einem Krystall Ferrosulfat, sowie 70 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 2,5 % versetzt. Beim Destillieren verflüchtigt sich Acetaldehyd, der durch einen Energiekühler in eine in Eis stehende Vorlage geleitet wird. Die Abspaltung des Acetaldehyds erfolgt allmählich und ist erst nach 3 maliger Nachfüllung[2]) von je 70 ccm Wasserstoffsuperoxyd mit darauffolgender Destillation beendet. Das gesammelte Destillat gab intensiven Ausfall der Reaktionen mit fuchsinschwefliger Säure, mit ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung und mit Nitroprussidnatrium plus Piperidin. Durch Fällung mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin wurde 0,417 g Hydrazon des Acetaldehyds erhalten.

2.

5,8 g Fumarsäure wurden mit 30 ccm Wasser übergossen und unter Zusatz eines Krystalles Ferrosulfat mit 140 ccm Wasserstoffsuperoxyd destilliert. Durch den Tropftrichter der Apparatur wurde noch 3 mal die gleiche Menge Wasserstoffsuperoxyd nachgefüllt und die Destillation jedesmal so lange fortgesetzt, bis die Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Piperidin negativ ausfiel.

Die Verdoppelung der Wasserstoffsuperoxydmenge bot keinen Vorteil. Es konnten nur 0,244 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon abgeschieden werden.

---

[1]) Auch aus Äthylamin erhielt K. Suto, wie später mitzuteilen ist, Acetaldehyd bei der Oxydation mit Hydroperoxyd und Eisensalz. Andere aliphatische und fettaromatische Amine verhalten sich entsprechend.

[2]) Wenn dabei eine Trübung durch Ausscheidung von basischem Eisensalz eintrat, so wurden einige Tropfen Schwefelsäure mit hinzugefügt.

3.

Eine geringe Erhöhung der Aldehydmenge erzielten wir durch wiederholte Destillation mit kleineren Mengen Wasserstoffsuperoxyd.

5,8 g Fumarsäure wurden mit 30 ccm Wasser übergossen und nach Zugabe von wenig Ferrosulfat mit 40 ccm H_2O_2 destilliert. Es wurden noch 7 mal je 40 ccm Wasserstoffsuperoxyd nachgegossen. Aus dem gesammelten Destillat, das alle Aldehydreaktionen sehr stark gab, konnten wir 0,488 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon abscheiden.

4.

5,8 g Fumarsäure wurden genau wie bei Versuch 3 8 mal mit 40 ccm Hydroperoxyd destilliert. Das gesammelte Destillat diente zu einer titrimetrischen Ermittelung des Aldehyds nach Ripper-von Fürth. Der Gehalt ergab sich zu 0,1998 g. Demnach sind rund 3,5 % vom Gewicht der Fumarsäure in Aldehyd übergeführt; da man die Bildung von 1 Molekül Acetaldehyd aus 1 Molekül Fumarsäure erwarten darf, so beträgt die erhaltene Menge Acetaldehyd 9,1 % der Theorie.

5.

5,8 g Maleinsäure wurden mit 30 ccm Wasser übergossen und mit 40 ccm Wasserstoffsuperoxyd und einem Krystall Ferrosulfat destilliert. Nach 7 maliger Wiederholung der Wasserstoffsuperoxydzugabe wurde das gesammelte Destillat, das alle Aldehydproben auf das kräftigste gab, mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin behandelt und lieferte 0,762 g der Acetaldehydverbindung.

6.

In einem weiteren Versuch mit 5,8 g Maleinsäure wurde die absolute Menge des Wasserstoffsuperoxyds ein wenig erhöht, indem im ganzen 8 Destillationen mit je 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd ausgeführt wurden. Die Menge des abgeschiedenen Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons belief sich hier auf 0,786 g.

7.

Zur titrimetrischen Bestimmung des aus Maleinsäure erhältlichen Acetaldehyds wurde ein Versuch genau wie sub 5 durchgeführt. Gefunden wurden 0,2446 g Acetaldehyd, gleich

rund 4,2 % vom Gewicht der Maleinsäure oder gleich 11,1 % der Theorie.

8.

6,0 g d, l-Glycerinsäure (88 %ige Säure, also gleich 5,3 g) wurden mit 60 ccm Wasserstoffsuperoxyd übergossen und mit 1 g Ferrosulfat versetzt. Bei der Destillation ging eine Flüssigkeit über, die starke Aldehydreaktionen nach Rimini, Chautard und Tollens gab. Erst nach 3 maliger Wiederholung der Operation mit der gleichen Menge H_2O_2 war die Aldehydabspaltung erloschen.

Die gesammelten Destillate wurden mit dem Destillationsgemisch eines analogen Ansatzes vereinigt und lieferten 0,234 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon.

9.

Schließlich wurde auch bei der Glycerinsäure eine titrimetrische Ermittelung der abgespaltenen Menge Aldehyd vorgenommen. Sie ergab — in den gesammelten Destillaten von 6,0 g der erwähnten 88 %igen Glycerinsäure mit 4 mal je 60 ccm Wasserstoffsuperoxyd — 0,0881 g Acetaldehyd gleich 4 % der möglichen Menge.

10.

Bei der Destillation von 6,0 g d-Weinsäure mit wechselnden Mengen Hydroperoxyd und Eisensalz wurde gleichfalls Acetaldehyd nachgewiesen. Die Menge war jedoch gering.

Bei der Bedeutung, die man dieser Bildung von Acetaldehyd aus den genannten Substanzen wohl beimessen darf, haben wir es nicht unterlassen, durch die Analyse der p-Nitrophenylhydrazone das Vorliegen von Acetaldehyd nochmals zu bestätigen.

a) Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon aus Fumarsäure:

0,0904 g Substanz gaben 19,4 ccm N (754 mm, 27°).
Gefunden 23,42 % N; berechnet 23,46 % N.

b) Analyse des Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons aus Maleinsäure:

0,0747 g Substanz gaben 16,0 ccm N (755 mm, 27°).
Gefunden 23,50 % N; berechnet 23,46 % N.

c) Analyse des Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons aus Glycerinsäure:

Während die Hydrazone des Aldehyds aus Fumar- und Maleinsäure den richtigen Schmelzpunkt, 127 bis 128°, zeigten, begann die Substanz aus Glycerinsäure bei 123° zu sintern und war bei 139° noch nicht vollständig geschmolzen. Allem Anschein nach handelt es sich hier um eine Beimischung eines Oxydationsproduktes der Glycerinsäure. Durch 4 maliges Umkrystallisieren der vereinigten Rohhydrazone aus 3 Ansätzen wie sub 9 gelangten wir zu einer nahezu richtig, bei 125 bis 126°, schmelzenden Verbindung. Die N-Analyse ergab einen durchaus befriedigenden Wert.

0,1206 g Substanz lieferten 25,5 ccm N (759 mm und 24°).
Gefunden 23,73 °/$_0$ N; berechnet 23,46 °/$_0$ N.

Über die Bildung von Thioschwefelsäure und Schwefelsäure aus Ätherschwefelsäuren und Sulfonsäuren.

Von

Carl Neuberg und Olga Rubin.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Von den Mineralsäuren finden sich zwei, die Phosphorsäure und die Schwefelsäure, verbreitet in der Natur als esterartige Verbindungen mit organischen Materialien; die Schwefelsäure kommt auch in Form von Sulfosäuren vor. Während der Umsatz der organischen Phosphorsäureverbindungen in seinen wesentlichen Punkten aufgeklärt ist, liegen die Verhältnisse bei den natürlichen Schwefelsäureestern anders, insbesondere sind die den Phosphatasen entsprechenden schwefelsäureabspaltenden Fermente kaum bekannt.

Auf der Suche nach solchen Enzymen haben wir zunächst das Verhalten von Bakterien in dieser Richtung geprüft und berichten darüber im folgenden:

Als Untersuchungsobjekte dienten uns einerseits die Chondroitinschwefelsäure in Form ihres reinen Natriumsalzes und andererseits das Stoffwechselprodukt Taurin; von synthetischen Substanzen kam noch äthylschwefelsaures Kalium zur Anwendung. Als Bakterienmaterial benutzten wir das Gemisch der natürlichen Fäulniserreger.

Qualitative Prüfung auf Schwefelsäurebildung.

Die erwähnten Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt; dann wurden die üblichen Nährsalze (Natriumphosphat, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Eisenchlorid sowie Kaliumbicarbonat) in Spuren hinzugegeben. Nach Auffüllung

auf ein bestimmtes Volumen wurde jede Lösung alsdann mit Faulmischung geimpft.

Versuch 1.

2,0 g Taurin mit Spuren Nährsalzen, 200 ccm Wasser plus 10 ccm Faulmischung.

Versuch 2 (Kontrolle zu 1).

2,0 g Taurin, Salze, 200 ccm Wasser plus 5 ccm Chloroform.

Versuch 3.

5,0 g chondroitinschwefelsaures Natrium, Spuren der Salze, 200 ccm Wasser und 10 ccm Faulmischung.

Versuch 4 (Kontrolle zu 3).

5,0 g chondroitinschwefelsaures Natrium, 200 ccm Wasser, Spuren der Salze, 5 ccm Chloroform.

Versuch 5.

2,0 g äthylschwefelsaures Kalium, 200 ccm Wasser, Spuren der Salze, zu denen sich hier noch etwas Chlorammonium gesellte, plus 10 ccm Fäulnisgemisch.

Versuch 6 (Kontrolle zu 5).

2,0 g äthylschwefelsaures Kalium, 200 ccm Wasser, Salze plus Chlorammonium sowie 5 ccm Chloroform.

Versuch 7.

10 ccm Fäulnisinfus wurden mit 200 ccm Wasser und den erwähnten Nährsalzen versetzt.

Alle 7 Versuche blieben 10 Tage im Brutschranke stehen und wurden täglich auf noch vorhandene alkalische Reaktion geprüft. Probe I und III wurden vorübergehend sauer und zeigten dann eine deutliche Schwefelwasserstoffentwicklung, erkenntlich am Geruch und durch Schwärzung eines in den Kolbenhals eingehängten Streifens von Bleipapier. Eingetretene saure Reaktion wurde jeweils durch Sodalösung beseitigt.

Nach 10tägigem Verweilen im Brutschranke wurden alle 7 Ansätze qualitativ auf Schwefelsäure geprüft. Hierzu wurden 5,0 ccm der mit Essigsäure schwach angesäuerten und aufgekochten Lösungen mit Bariumchlorid versetzt. Dabei ergab sich folgendes:

Versuch	1.	Taurin:	Deutliche Trübung.
„	2.	(Kontrolle zu 1):	Schwache Trübung.
„	3.	Chondroitinschwefelsaures Natrium:	Starke Fällung.
„	4.	(Kontrolle zu 3):	Schwache Trübung.
„	5.	Äthylschwefelsaures Kalium:	Schwache Trübung.
„	6.	(Kontrolle zu 5):	Sehr schwache Trübung.
„	7.	(Fäulnismischung allein):	Kaum wahrnehmbare Trübung.

Quantitative Bestimmungen von abgespaltener Schwefelsäure.

Versuch A.

2,0 g Taurin wurden mit 200 ccm Wasser, dem erwähnten Gemisch der Nährsalze sowie mit 10 ccm Fäulnismischung versetzt und unter dauernder Aufrechterhaltung der alkalischen Reaktion 10 Tage lang bebrütet. Alsdann wurde die gesamte Mischung mit einigen Tropfen starker Essigsäure angesäuert, zum Sieden erhitzt und durch ein doppeltes Barytfilter filtriert.

In 50,0 ccm der klaren Lösung wurde alsdann die Schwefelsäure durch Bariumchlorid niedergeschlagen und nach 24stündigem Stehen bestimmt.

In 3 Analysen erhielten wir folgende Werte für je 50,0 ccm Filtrat:

a) 0,0038 g $BaSO_4$,
b) 0,0040 g $BaSO_4$,
c) 0,0037 g $BaSO_4$,
im Mittel: 0,00383 g $BaSO_4$.

Im Durchschnitt sind also aus 2,0 g Taurin 0,0161 g $BaSO_4$ erhalten worden.

Versuch B.

Zur Kontrolle wurde eine Lösung von 2,0 g Taurin in 200 ccm Wasser mit den Nährsalzen und 5 ccm Chloroform 10 Tage gleichzeitig im Brutschrank aufbewahrt. In 50,0 ccm der essigsauer gemachten Mischung wurden 0,0026 g Bariumsulfat gefunden, im ganzen also 0,0104 g $BaSO_4$.

Woher auch die Schwefelsäure im antiseptischen Versuch mit Taurin stammen mag — sei es aus Verunreinigungen, sei es aus einer geringfügigen Zersetzung — jedenfalls ist die

Differenz zwischen beiden Ansätzen sehr gering, so daß man nur auf eine minimale Abspaltung von Schwefelsäure aus Taurin unter der Einwirkung der Fäulnis schließen dürfte, falls man den absolut so geringen Daten überhaupt Beweiskraft beimessen will.

Versuch C.

5,0 g chondroitinschwefelsaures Natrium wurden mit 200 ccm Wasser, den Nährsalzen sowie mit 10 ccm Faulmischung versetzt und 10 Tage lang unter Kontrolle der stets alkalisch zu erhaltenden Reaktion im Brutschrank aufbewahrt. Alsdann wurde die Lösung schnell aufgekocht und klar filtriert. In 50,0 ccm wurde alsdann die Schwefelsäurebestimmung ausgeführt, indem dieselben mit verdünnter Essigsäure versetzt, schnell zum Sieden erhitzt und sofort mit Bariumchloridlösung gefällt wurden. Jede längere Erwärmung wurde vermieden. Das Bariumsulfat wurde am nächsten Tage abfiltriert und sehr gründlich mit heißem Wasser ausgewaschen. Wenn die Entfernung anhaftender Chondroitinschwefelsäure angenommen werden konnte, wurde der Bariumsulfatniederschlag zunächst mit kalter, dann mit heißer, verdünnter Salzsäure bis zum Verschwinden der Bariumreaktion ausgewaschen. Gefunden wurden in 3 Proben:

a) 0,2055 g $BaSO_4$,
b) 0,2062 g $BaSO_4$,
c) 0,2054 g $BaSO_4$,
im Durchschnitt also 0,2057 g $BaSO_4$.

Der ganze Fäulnisansatz (210 ccm) lieferte also 0,8640 g $BaSO_4$ = 0,1186 g S. Bei einem Gehalt des Natriumchondroitinsulfats an 5,8 % S (s. S. 89) sind das 41 % der theoretisch möglichen Menge.

Versuch D.

a) Eine Lösung von 5,0 g chondroitinschwefelsaurem Natrium und 200 ccm Wasser plus Nährsalzen und 5 ccm Chloroform wurde gleichzeitig 10 Tage im Brutschrank aufbewahrt.

Zur Bestimmung der freien Schwefelsäure dienten hier 100,0 ccm klar filtrierter Lösung, die bei der gleichen Behandlung mit Essigsäure und Bariumchlorid 0,0074 g $BaSO_4$ lieferten.

b) Eine Wiederholung der Kontrolle mit den gleichen

Mengen, aber an einem anderen Ansatz, ergab für 100,0 ccm 0,0079 g $BaSO_4$.

Demnach sind aus 5,0 g chondroitinschwefelsaurem Natrium bei antiseptischer Aufbewahrung seiner Lösung in 10 Tagen im Mittel nur 0,0153 g $BaSO_4$ erhalten worden, das sind 17,7 % jener Menge, die der eigentliche Faulversuch lieferte.

Versuch E.

Die analoge Anstellung von Versuchen mit 2,0 g äthylschwefelsaurem Kalium in 200 ccm Salzlösung mit und ohne Faulmischung ergab für 50,0 ccm Filtrat so minimale absolute Zahlen, daß eine Abspaltung von Schwefelsäure aus der Äthylschwefelsäure durch Fäulnis unter den gewählten Bedingungen nicht angenommen werden kann.

Versuch F.

Schließlich wurde noch die Menge Schwefelsäure bestimmt, die bei 10tägiger Digestion von 200 ccm Wasser mit 10 ccm Fäulnismischung und den Nährsalzen bei 37° frei wird. In 100,0 ccm des Filtrats wurden in essigsaurer Lösung einmal 0,0003 g und in einem anderen Versuch 0,0002 g $BaSO_4$ durch Bariumchlorid niedergeschlagen. Im Durchschnitt ist also die verschwindende Menge von 0,0005 g $BaSO_4$ aus der ganzen Fäulnismischung allein erhalten worden.

Qualitative Prüfung auf Thiosulfatbildung.

Wie zuvor erwähnt ist, entwickelte sich in einigen Ansätzen Schwefelwasserstoff, wenn die Reaktion sauer geworden war, während im neutralen Milieu eine solche Bildung nicht ersichtlich war. Dieses Verhalten deutete auf die Anwesenheit von unterschwefligsaurem Salz hin.

In der Tat konnte sowohl in den erwähnten Fäulnisansätzen mit Taurin als mit chondroitinschwefelsaurem Natrium die Gegenwart von Thiosulfat durch die Reaktion mit Sublimatlösung, mit der Silbernitratprobe sowie durch die Sulfitprussidnatriumfärbung nachgewiesen werden, in ähnlicher Weise wie dieses Salkowski[1]) für die Ausführung von Thiosulfatbestimmungen im Harn empfohlen hat.

---

[1]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 89, 485, 1914.

1. Beim Erhitzen mit einigen Tropfen verdünnter Quecksilberchloridlösung entstand in der filtrierten Faulmischung ein grauer Niederschlag, der langsam gelbbraun und schließlich schwarz wurde; er wurde von verdünnter Salpetersäure (33 °/₀ig) kaum gelöst, war also HgS.

2. Einige Kubikzentimeter filtrierter Faulmischung gaben auf Zusatz von Silbernitratlösung zuerst einen graugelben Niederschlag, der beim Erwärmen braun und schließlich schwarz wurde. (Bildung von Ag_2S.)

3. 50 ccm Filtrat der Faulmischung wurden aus einem Destillationskolben, der durch einen seitlichen Ansatz mit einem Kühler verbunden war, mit 25 ccm Salzsäure (D = 1,125) destilliert. Im Kühlrohr trat bald der charakteristische ringförmige Anflug von Schwefel auf. In den ersten 5 ccm des Destillats war schweflige Säure[1]) durch Zugabe von wenig Natriumbicarbonat, Nitroprussidnatrium und viel Zinksulfat durch die rosarote Färbung des Sulfitprussidnatriums, $Na_5S_2O_3FeCN$, nachweisbar, die sich auf Zusatz von Ferrocyankalium noch vertiefte und an einem bald entstehenden roten Niederschlage haftete.

Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß weder in der Faulmischung allein, noch in den mit Chloroform digerierten Lösungen von Taurin und Chondroitinschwefelsäure eine Bildung von Thioschwefelsäure nachweisbar war.

Quantitative Bestimmungen von Thiosulfat.

A. Im klaren Filtrat des mehrfach erwähnten Fäulnisansatzes von 2,0 g Taurin wurde das Thiosulfat entsprechend den Angaben von Salkowski (l. c.) durch Erwärmung mit Silbernitrat und durch nachfolgende Überführung des erhaltenen Silbersulfids in Schwefelsäure (mittels Soda-Salpeterschmelze) ermittelt. Aus 50,0 ccm wurden gewonnen 0,0298 g Bariumsulfat.

Durch die Fällung mit Silbernitrat wird bekanntlich nur die Hälfte des im Thiosulfat enthaltenen Schwefels als Silbersulfat erhalten, während die andere Hälfte als Schwefelsäure in Lösung bleibt:

$$Ag_2S_2O_3 + H_2O = Ag_2S + H_2SO_4.$$

[1]) Fresenius, Qualitative Analyse. 16. Aufl. 1910. S. 267. — Gmelin-Friedheim I, Abt. 1, 1907. S. 464.

Demnach ist unser obiger, auf dem Wege über das Silbersulfid erhaltener Wert für Bariumsulfat zu verdoppeln. Es ist also in 50,0 ccm Filtrat eine Menge Thiosulfatschwefel, die 0,0596 g Bariumsulfat entspricht.

Wir haben im Filtrat vom abgeschiedenen Schwefelsilber auch die frei gewordene Schwefelsäure direkt bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde mit Salzsäure angesäuert, vom ausgeschiedenen Chlorsilber abfiltriert, ausgewaschen und nunmehr mit Bariumchlorid die Schwefelsäure in gewohnter Weise gefällt. Dadurch wurden direkt 0,0340 g Bariumsulfat bestimmt, ein Wert, der an sich, und namentlich unter Berücksichtigung der präformierten Schwefelsäuremenge (s. Versuch A, S. 84), hinreichend mit der Ableitung der Thiosulfatmenge aus der Silberfällung übereinstimmt.

B. Bei dem großen Interesse, das diese offenbar starke Thiosulfatbildung aus Taurin beanspruchen darf, haben wir noch einen weiteren Fäulnisansatz in gleicher Weise analysiert.

a) Bariumsulfat aus der Silberfällung von 50,0 ccm Taurinfäulnis = 0,0282 g; verdoppelt = 0,0564 g.

b) Direkte Bestimmung der Schwefelsäure im Filtrat der Silberfällung ergab 0,0317 g $BaSO_4$.

Im Durchschnitt ist also die 0,2436 g $BaSO_4$ entsprechende Thiosulfatmenge aus 2,0 g Taurin, d. h. etwa 6,5 % der Theorie, erhalten worden.

C und D. Die analoge Ermittelung von Thiosulfat bei der Fäulnis von chondroitinschwefelsaurem Natrium konnten wir nur in der Silberfällung[1]) vornehmen, da eine Verarbeitung des mit Salzsäure entsilberten Filtrats angesichts der Zersetzlichkeit der Chondroitinschwefelsäure zu ungenau gewesen wäre.

Es wurden zwei der erwähnten Ansätze mit 5,0 g chondroitinschwefelsaurem Natrium untersucht, die in guter Übereinstimmung in 50 ccm 0,0536 bzw. 0,0572 g Bariumsulfat, also pro 100,0 ccm 0,1072 bzw. 0,1144 g Thiosulfatschwefel

[1]) Das Silbersulfid blieb beim Erhitzen zum Teil in kolloidaler Lösung; durch einen Zusatz von wenig reinem NaCl gelang es, das Ag_2S mit dem AgCl in filtrierbarer Form auszufällen.

entsprechendes Bariumsulfat, im Durchschnitt demnach 0,2216 g $BaSO_4$, lieferten.

Auf den ganzen Ansatz macht das 0,2327 g $BaSO_4$ = 0,032 g S aus. Von den 5,8 % Schwefel des chondroitinschwefelsauren Natriums[1]) sind demnach 11,0 % in Thiosulfatschwefel umgewandelt worden.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß in allen Fällen eine Berücksichtigung der Filterasche vorgenommen worden ist und nur sulfatfreie Reagenzien verwendet worden sind.

Ob die erwiesene Bildungsweise von Schwefelsäure und Thioschwefelsäure auch unter natürlichen Verhältnissen stattfindet, muß dahingestellt bleiben. Sie ist jedoch wahrscheinlich, da schon vor Jahren Salkowski[2]) einen Übergang von Thiosulfat in den Harn nach Verfütterung von Taurin beim Kaninchen beobachtet hat, und man wird nicht fehlgehen, wenn man für die an allen möglichen Stellen der Organismen vorkommenden Chondroitsäuren eine ähnliche Umwandlung annimmt.

Die große Konstanz der Ergebnisse spricht in diesem Sinne; freilich stellt Faulmischung kein einheitliches Bakterienmaterial vor, aber sie entspricht dafür am meisten den in der Natur obwaltenden Verhältnissen. Es soll weiter untersucht werden, ob die direkte Abspaltung von Schwefelsäure auf die Wirkungen eines besonderen Fermentes, einer Sulfatase, zurückgeführt werden kann.

---

[1]) Das von uns benutzte chondroitinschwefelsaure Natrium enthielt 2,50 % N, 5,78 % S und 8,47 % Na in trockenem Zustande; es gab mit $BaCl_2$ in essigsaurer Lösung den Hauch eines Niederschlages von Bariumsulfat. Das Verhältnis von N : S : Na ist gleich 178 : 181 : 380, also rund gleich 1 : 1 : 2. Dieser Befund steht gut mit den Angaben von K. Kondo (diese Zeitschr. **26**, 116, 1910) im Einklange, der als Formel $C_{15}H_{27}O_{16}NS$ vorschlägt. Die jüngst von P. A. Levene und F. B. La Forge (Journ. of Biol. Chem. **15**, 157, 1913) angenommene Zusammensetzung läßt gleichfalls das genannte Verhältnis von N : S : 2 Na zu. Allein das von den Autoren angegebene Formelbild (l. c. **15**, 157) ist unmöglich, da es zwei fünfwertige C-Atome enthält und die l. c. **18**, 239 angegebene Formel ist lückenhaft. Sollten die Spekulationen der Verfasser zur Aufstellung einer Formel dienen, so müßte sie wohl anders, etwa $C_{25}H_{44}O_{29}N_2S_2$, lauten.

[2]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiolog. Chem. **10**, 109, 1886.

Das Verhalten der *α*-Ketosäuren zu Mikroorganismen.

I. Mitteilung.

Die Fäulnis von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie zu Berlin-Dahlem.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Veränderungen stickstoffhaltiger Substanzen, insbesondere der Eiweißkörper und Aminosäuren, durch Bakterien sind vielfach studiert und ihrem Wesen nach in großen Zügen bekannt. Viel weniger sind wir über die Umwandlungen unterrichtet, welche die N-freien Materialien unter dem Einflusse von Bakterien erleiden.

Bei der großen Bedeutung, welche die *α*-Ketosäuren in der letzten Zeit in mannigfacher Richtung für die Erkenntnis physiologischer Prozesse erlangt haben, ist es wichtig, die Einwirkung der Bakterien auf diese Substanzen zu studieren.

Da nur in den seltensten Fällen unter den natürlichen Bedingungen Reinkulturen zur Wirkung gelangen, so haben wir unsere Aufmerksamkeit zunächst dem Verhalten dieser *α*-Ketosäuren bei dem weit verbreiteten Prozeß der Fäulnis zugewandt und zuerst die Brenztraubensäure und die Oxalessigsäure geprüft.

Die Versuchsanordnung war ganz ähnlich der, wie sie von Neuberg und Mitarbeitern mehrfach für die Fäulnis einzelner Aminosäuren verwendet worden ist.[1]) Die beiden Ketosäuren

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **1**, 368, 1906; **37**, 490 u. 501, 1911; C. Neuberg und E. Rosenberg, diese Zeitschr. **7**, 178, 1907; W. Brasch und C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 299, 1908; C. Neuberg und C. Cappezzuoli, diese Zeitschr. **18**, 424, 1909.

kamen in verdünnter, ungefähr 1 % iger Lösung zur Anwendung, die mit Natriumkarbonat neutralisiert und mit den üblichen anorganischen Nährsalzen versetzt waren. Als Stickstoffquelle wurden kleine Mengen Ammoniumsulfat und Kaliumnitrat hinzugefügt. Als Fäulniserreger verwendeten wir einige ccm Faulflüssigkeit, die nach Salkowskis Vorschrift durch 24stündige Digestion von gehacktem Rindfleisch in sodaalkalischer Lösung gewonnen war.

Die Resultate, die wir bei unseren Fäulnisversuchen erhielten, stehen in bemerkenswerter Analogie zu den Erfahrungen bei der Hefeeinwirkung auf dieselben α-Ketosäuren. Während unter dem Einfluß der Carboxylase eine einfache Spaltung der Ketosäuren in Kohlendioxyd und den Aldehyd der nächst niederen Reihe erfolgt, bringen die Fäulnisbakterien gleichfalls eine Kohlenstoffkettenverkürzung unter Abspaltung von Kohlensäure zuwege; dabei entsteht jedoch nicht ein Aldehyd, sondern die zugehörige Fettsäure.

So liefert die Fäulnis von Brenztraubensäure als Hauptprodukt Essigsäure.

Dieses Resultat, das eine Oxydation anzeigt, erscheint zunächst sonderbar, da die Fäulnisvorgänge bekanntlich in erster Linie Reduktionsprozesse darstellen. In der Tat findet man bei der Fäulnis der α-Ketosäuren auch tiefgreifende Reduktionsvorgänge, wenn man die neben den Fettsäuren entstandenen Produkte betrachtet. Es entwickelt sich nämlich massenhaft Wasserstoff, den man durch Zerlegung des vorhandenen Wassers sich entstanden denken kann. ($CH_3.CO.COOH + O.H_2 = CH_3.COOH + CO_2 + H_2$). Nebenher bilden sich auch nicht unbeträchtliche Mengen Ameisensäure (bis 22 %), die vielleicht einer Reduktion der Kohlensäure durch den abgespaltenen Wasserstoff in statu nascendi ihre Entstehung verdanken. Selbstverständlich kann man die Bildung von Ameisensäure und Essigsäure aus Brenztraubensäure auch als eine hydroklastische Reaktion im Sinne der Formulierung:

$$\begin{matrix} CH_3.CO \\ | \\ COOH \end{matrix} + \begin{matrix} OH \\ | \\ H \end{matrix} = \begin{matrix} CH_3.COOH \\ + \\ H.COOH. \end{matrix}$$

auffassen.

Das massenhafte Auftreten von Wasserstoff und das Überwiegen der Essigsäure über die Quantität der Ameisensäure spricht dafür, daß Ameisensäure wohl sekundär durch den nascierenden Wasserstoff aus einem Teil der abgespaltenen Kohlensäure hervorgeht. Die Umwandlung der Brenztraubensäure in Essigsäure konnten wir bis zu $50^0/_0$ der Theorie erreichen. In anderen Fällen war sie geringer. Die Ausbeute an Ameisensäure schwankt in den einzelnen Versuchen nicht unerheblich.

Die Fäulnis der Oxalessigsäure liefert dieselben Produkte wie die der Brenztraubensäure, d. h. neben Kohlendioxyd in erster Linie Essigsäure. Auch hierbei offenbart sich die Analogie mit der Hefeeinwirkung, da die Carboxylase gleichfalls aus der Oxalessigsäure unter Abspaltung von 2 Molekülen CO_2 Acetaldehyd erzeugt. Dieser verhältnismäßig glatte Übergang einer Säure der C_4-Reihe in die C_2-Reihe ist recht bemerkenswert. Die gebildete Essigsäure dürfte kaum durch eine Säurespaltung der Oxalessigsäure entstehen, die neben Essigsäure Oxalsäure ergeben würde. Wir haben keinerlei Anhaltspunkte für die Entstehung von Oxalat gewinnen können. Dagegen treten gleichfalls Wasserstoff und Ameisensäure auf.

Demnach sind die beiden folgenden Spaltungen anzunehmen:

$$1.\quad COOH.CH_2.CO.COOH + O.H_2 = \\ = CO_2 + CH_3.COOH + CO_2 + H_2$$

und

$$2.\quad \begin{matrix} COOH.CH_2.CO \\ | \\ COOH \end{matrix} + \begin{matrix} OH \\ | \\ H \end{matrix} = \\ = CO_2 + CH_3.COOH + H.COOH.$$

Diese Fäulnisprozesse verlaufen mit großer Intensität. Innerhalb einer Woche ist das Ausgangsmaterial verbraucht, während in gleichzeitig angesetzten antiseptischen Kontrollen sowohl Brenztraubensäure wie Oxalessigsäure (oder zum mindesten die aus letzterer hervorgegangene Brenztraubensäure) bei der Digestion im Brutschrank erhalten bleiben. Die Gasentwicklung während der Fäulnis ist eine sehr

lebhafte und insbesondere bei der Brenztraubensäure fast stürmisch. Ungefähr am 3. Tage entweicht ein kontinuierlicher Strom von Gasblasen in einer Stärke, wie man das sonst nur bei Hefegärungen zu sehen gewohnt ist! Dieses Gas, das sich tagelang entwickelt, besteht, wie aus den Ausführungen im experimentellen Teil hervorgeht, außer aus Kohlensäure aus Wasserstoff, denen Spuren von Methan beigemengt sind. Die Herkunft des Grubengases kann kaum zweifelhaft sein; es findet in geringem Umfange der bekannte Zerfall der Essigsäure statt.

Die Umwandlung der α-Ketosäuren durch Fäulnis in die Fettsäuren der nächst niederen Reihe entspricht vollständig dem jetzt klargestellten Übergange der Aminosäuren unter Desaminierung und Kohlenstoffkettenverkürzung in die Fettsäuren der nächst niederen Reihe. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß als erste Phase der physiologischen Umwandlung von Aminosäuren die α-Ketosäuren auch bei der Fäulnis auftreten, ähnlich wie es Neubauer und Fromherz[1]) für den Stoffwechsel der Tiere und der Hefe angenommen haben.

Ob bei der bakteriellen Umwandlung der α-Ketosäuren auch Reduktionsprozesse ohne Kohlenstoffkettenverkürzung, etwa ein Übergang von Brenztraubensäure in Milchsäure oder von Oxalessigsäure in Bernsteinsäure, stattfinden, muß dahingestellt bleiben.

Nach den Befunden von L. Karczag und L. Móczár[2]) über die Einwirkung von Bact. coli und paratyph. auf Brenztraubensäure scheint das durchaus möglich, da die genannten Forscher hier unter anderem Propionsäure gefunden haben, während merkwürdigerweise die Essigsäure zu fehlen scheint. Allerdings ist der Reaktionsverlauf beim Colibacillus, einem ausgesprochenen Kohlehydratzehrer, wohl wesentlich anders als bei den Fäulniserregern und führt nach den Angaben der Autoren zu keinem Umwandlungsprodukt, das für den Eintritt einer bestimmten Zersetzung charakteristisch wäre.

---

[1]) O. Neubauer, Biochem. Handlex. 4, 360, 1911.

[2]) L. Karczag und L. Móczár, diese Zeitschr. 55, 79, 1913.

Experimentelles.

Bearbeitet von J. Jamakawa.

A. Fäulnis der Brenztraubensäure.

Versuch 1.

8 ccm = 10 g krystallisierbarer[1]) Brenztraubensäure wurden in 800 ccm Leitungswasser gelöst und mit verdünnter Kaliumcarbonatlösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion auf Lackmus versetzt. Hierzu wurde je ein Körnchen der folgenden Salze gegeben: Dinatriumphosphat, Calciumchlorid, Natriumchlorid, Eisenchlorid, Magnesiumsulfat sowie zwei größere Krystalle von Ammoniumsulfat und Kaliumnitrat.

Das Gemisch wurde auf 1000 ccm aufgefüllt und mit 5,0 ccm Fäulnisinfus versetzt, der 24 Stunden alt war. Beim Stehen im Brutschrank fiel bereits nach 4 Tagen die Reaktion auf unveränderte Brenztraubensäure mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge negativ aus. Die Gasentwicklung, die am Ende des zweiten Tages eingesetzt hatte, dauerte noch fort, war aber nach einer Woche nicht mehr wahrnehmbar. Nunmehr wurde das Gemisch mit 90 ccm 25 $^0/_0$ iger Phosphorsäure angesäuert und so lange mit Wasserdampf destilliert, bis die Reaktion des Übergegangenen nicht mehr sauer war. So wurden 8720 ccm gewonnen, deren Acidität — nach einer Bestimmung an einem aliquoten Teile — 104,9 ccm n-Natronlauge entsprach.

Die Hauptmenge wurde alsdann mit Natriumcarbonatlösung schwach alkalisiert und auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit ungefähr 60 ccm siedendem Alkohol ausgezogen und die darin unlöslichen Salzmassen nach Durchfeuchtung mit einigen Tropfen Wasser noch 10 mal der gleichen Extraktion mit Alkohol unterworfen.

Die vereinigten alkoholischen Auszüge wurden in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade eingedampft, wobei sich zum Schluß weiße Krystalle abschieden. Die Menge der so erhaltenen Natriumsalze betrug 7,89 g.

Aus dem Verhalten zu Silbernitrat ergab sich, daß in dem Natriumsalz keine einheitliche Verbindung vorlag, indem neben einem beständigen Silbersalz ein sich schnell schwärzendes zu-

---

[1]) d. h. im Kältegemisch erstarrender.

gegen war. Letzteres war das Salz der Ameisensäure, die sich auch durch die Prüfung mit Quecksilberchlorid zu erkennen gab.

Die Menge der vorhandenen Ameisensäure (α) bestimmten wir nach der bequemen Methode, die H. Fincke[1]) für diesen Zweck angegeben hat. Dann ermittelten wir die neben dem Formiat vorhandenen Fettsäuren nach der von Brasch und Neuberg[2]) angegebenen Methode (β).

α) Ameisensäurebestimmung:

2,5 g reinstes NaCl, 3 g $HgCl_2$ und 1 g Natriumacetat wurden in 250 ccm Wasser gelöst und klar filtriert. Dann wurden 0,5000 g unseres im Vakuumexsiccator getrockneten Natriumsalzgemisches hinzugegeben und die Flüssigkeit unter Bedeckung mit einem Uhrglase 2 Stunden lang auf dem Wasserbade erhitzt.

Es schied sich rein weißes Kalomel, HgCl, aus, das noch warm auf einem Goochtiegel abfiltriert und nach dem Auswaschen mit Wasser, absolutem Alkohol und Äther sowie nach einstündigem Trocknen bei ca. 95° gewogen wurde.

0,5000 g Natriumsalz lieferten 0,7682 g HgCl; letzteres entspricht[3]) 0,0749 g HCOOH oder 0,1109 g HCOONa[4]).

22,18% Natriumformiat waren demnach in unserer Substanz vorhanden.

β) Essigsäurebestimmung.

Zur Ermittlung der Essigsäure wurden 4,0000 g unseres Natriumsalzes in 400 ccm Wasser gelöst und mit 6 ccm verdünnter Schwefelsäure sowie 6 g festem Mercurisulfat versetzt. Das Gemenge wurde 2 Stunden lang am gut wirkenden Rückflußkühler im gelinden Sieden erhalten. Nach völligem Erkalten und Ausspülen des Kühlers mit wenig Wasser wurde filtriert und das in Lösung befindliche Quecksilber durch Schwefelwasserstoff ausgefällt, der absorbierte Teil des letzteren durch einen Luftstrom ausgetrieben und die Schwefelsäure nunmehr durch einen Überschuß von warmem, reinem Baryt-

---

1) H. Fincke, diese Zeitschr. **51**, 253, 1913.

2) W. Brasch und C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 299, 1908.

3) Umrechnungsfaktor 0,0975.

4) 46 g Ameisensäure = 68 g Natriumformiat, also Umrechnungsfaktor rund = $^3/_2$.

wasser gefällt. Ohne Filtration von Bariumsulfat wurde alsdann Kohlensäuregas zwecks Entfernung gelösten Bariumhydroxyds eingeleitet. Nunmehr wurde durch ein Barytfilter abfiltriert und mit heißem Wasser gründlich ausgewaschen. Das Filtrat wurde ungefähr auf 10 ccm eingeengt und von nochmals ausgeschiedenen Spuren Bariumcarbonats getrennt. Die Flüssigkeit reagierte schwach alkalisch und wurde hier und in den späteren Fällen genau mit Salpetersäure neutralisiert.

Auf Zugabe von 50%iger Silbernitratlösung fiel jetzt ein dicker Brei eines rein weißen, recht lichtbeständigen Silbersalzes aus, das nach mehrstündigem Stehen in der Kälte und im Dunkeln auf der Nutsche abgesaugt, erst mit 50%igem Alkohol, dann mit absolutem Alkohol ausgewaschen wurde. Nach dem Trocknen im Dunkelexsiccator wog die Menge des erhaltenen Silbersalzes 4,07 g (entsprechend 2 g wasserfreiem Natriumacetat).

0,2184 g Substanz gaben beim Verglühen: 0,1410 g Ag = 64,56%.

Da essigsaures Silber 64,67% Ag enthält, liegt reines Silberacetat vor.

Versuch 2.

Als Kontrolle wurde eine genau so bereitete Lösung aus 8 ccm Brenztraubensäure mit Kaliumcarbonat und den übrigen Salzen in 1 l Wasser hergestellt, ohne Fäulnismischung, aber mit Zusatz von einigen Kubikzentimetern Chloroform im Brutschrank in fest verschlossener Flasche aufbewahrt. Es erfolgte hier nicht die geringste Gasentwicklung, und selbst nach 6 Wochen konnte unveränderte Brenztraubensäure mit der Nitroprussidnatriumprobe nachgewiesen werden.

Versuch 3.

Die Lösung von 8 ccm Brenztraubensäure in 1 l Wasser wurde nicht mit Kaliumcarbonat, sondern mit 20 g festem Calciumcarbonat neutralisiert, das zum Teil ungelöst sich zu Boden setzte. Daneben wurden die vorher erwähnten Salze und eine Spur KCl hinzugegeben. Die Fäulnis wurde durch Zugabe von 10 ccm Fleischinfus eingeleitet. Nach ungefähr 3 Tagen trat wieder eine kräftige Gasentwicklung auf, die hier etwas länger, bis zum 9. Tage, anhielt. Die Flüssigkeit, die schwach alkalische Reaktion zeigte, wurde nach

12 Tagen mit 175 ccm 25 % iger Phosphorsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat betrug 10800 ccm und zeigte eine Acidität = 106 ccm n-Natronlauge. Durch Neutralisation mit Soda wurde in der bei Versuch 1 angegebenen Art das Natriumsalz bereitet, das nach dem Eindampfen und nach der beschriebenen Extraktion mit Alkohol in einer Menge von 8,26 g erhalten wurde. Auch dieses Salz war ein Gemisch von Acetat mit Formiat.

α) Ameisensäurebestimmung.

1,0000 g Salz lieferte 0,2708 g HgCl = 0,0264 HCOOH oder 0,0390 g HCOONa.

Es waren also 3,90 % Natriumformiat zugegen.

β) Essigsäurebestimmung.

3,0002 g Natriumsalz lieferten — nach Zerstörung der Ameisensäure mit saurem Quecksilbersulfat nach Brasch und Neuberg — 2,775 g reines Silbersalz.

0,2366 g Silbersalz gaben 0,1530 g Silber.

$CH_3.COOAg$ berechnet: 64,67 % Ag;
gefunden: 64,66 %.

Demnach lag Silberacetat in höchster Reinheit vor.

Versuch 4.

Wie erwähnt, entweichen im Verlauf der Gärung Ströme von Gas. Um seine Zusammensetzung zu erkennen, haben wir dasselbe in geeigneter Weise aufgefangen. Zu diesem Zweck diente folgende Versuchsanordnung.

Das im Brutschrank befindliche Gärgefäß wurde mit einem auf dem Thermostaten gestellten Azotometer durch ein Glasrohr verbunden, das durch eine in der Decke des Brutschrankes angebrachte tubulierte Öffnung die Verbindung zwischen beiden Gefäßen herstellte und als Gasentbindungsrohr diente. Ein zweites, bis auf den Boden des Gärgefäßes reichendes Glasrohr war gleichfalls seitlich aus dem Brutschrank durch einen anderen dort angebrachten Tubus mit Gummistopfenverschluß hindurchgeführt und mit einem Kohlensäureentwicklungsapparat verbunden.

Da es uns im wesentlichen darauf ankam, die Entwicklung von anderen Gasen neben CO_2 festzustellen, so verdrängten wir aus

dem System nach Einbringung der Gärmischung die Luft durch Kohlensäure. Dann wurde die Kohlensäurezuleitung abgestellt und das durch die Gärung entwickelte Gas im Azotometer über 30 %iger Kalilauge aufgefangen. Zum Schluß wurde wiederum aus dem Entwicklungsapparat Kohlendioxyd hindurchgeleitet. Selbstverständlich war durch Verwendung von Kapillarschlauch das Eindringen von atmosphärischen Gasen nach Möglichkeit verhindert.

Der in das Gärgefäß eingefüllte Fäulnisansatz war genau wie der des Versuchs 1 zusammengesetzt. Er lieferte im Laufe von 7 Tagen 252 ccm nicht absorbierbares Gas. Dasselbe war brennbar und verpuffte nach Beimengung von Luft. Daß es sich im wesentlichen um Wasserstoff handelte, zeigt die Analyse des Versuchs 5.

Die in Lösung befindlichen Fäulnisprodukte wurden genau wie in Versuch 1 und 3 isoliert und analysiert. Aus der phosphorsauren Lösung wurden 1400 ccm Destillat mit einer Acidität von 120 ccm n-Natronlauge erhalten. Die Ausbeute an alkohollöslichen Natriumsalzen war 7,72 g.

α) 0,8720 g des rohen Natriumsalzes lieferten die 0,0970 g Natriumformiat entsprechende Menge Kalomel = 11,12 %.

β) 5,0 g rohes und dann vom Formiat befreites Natriumsalz lieferten 3,64 g Silberacetat mit einem Gehalt von 65,01 % Silber.

Versuch 5.

Um einen genaueren Aufschluß über die Natur der Gärungsgase zu erhalten, wurde ein Versuch in dem beifolgend abgebildeten Apparat angestellt. Hier wurde von einer Füllung mit Kohlensäure abgesehen und das Gas in die kleine Gasbürette unter dem eigenen Druck übergetrieben.

Als Gärgefäß diente ein Jenenser Stehkolben von 100 ccm Inhalt. Derselbe wurde wie das Eudiometer samt den Ab- und Zuflußröhren mit einer Auflösung von 1,2 ccm Brenztraubensäure in 150 ccm Wasser gefüllt, welch letzteres, nach Zugabe von Soda und den angeführten Salzen in dem erwähnten Verhältnis, durch Auskochen von Luft befreit war. Als Impfmaterial dienten 3 ccm Fäulnismischung. Das Eudiometer *E* kommunizierte mit Hilfe eines Glashahns *H* mit dem Gärgefäß *G*. Das entwickelte Gas stieg durch das Zuleitungsrohr *Z* auf und verdrängte durch

das Abflußrohr *a* die Sperrflüssigkeit, die mit Hilfe eines durch den Quetschhahn *Q* verschließbaren Schlauches in die gleichfalls mit der Lösung gefüllte flache Porzellanschale *P* tropfte. Die Apparatur ist stabil und kann bequem im Brutschrank untergebracht werden. Nach Beendigung des Versuches schließt man die Hähne *H* und *Q*, versenkt die Gefäße in eine pneumatische Wanne und ersetzt den Gummistopfen *S* durch ein zu den Gasanalyseapparaten passendes Verbindungsstück. Das in den Eudiometern angesammelte Gas hatte nach mehreren Analysen von Herrn Geheimrat Zuntz, dem wir auch an dieser Stelle für seine Mühewaltung verbindlichst danken, folgende Zusammensetzung:

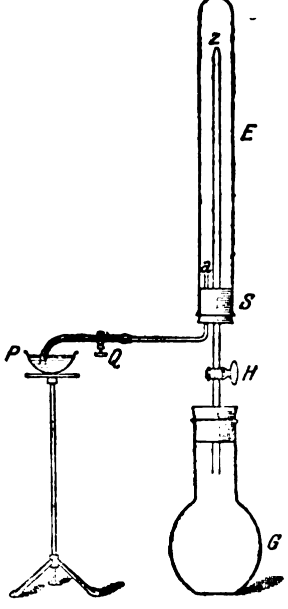


Fig. 1.

I. 1. Analyse: 88,79 % CO_2, 7,55 % H_2, 0,88 % CH_4.
2. Analyse: 88,94 % CO_2, 7,60 % H_2, 0,71 % CH_4.

Mittel: 88,86 % CO_2, 7,58 % H_2, 0,80 % CH_4.
Summa = 97,24 %;
2,76 % eingedrungene Luft.

Versuch 6.

Gleichzeitig wurde in einem zweiten ebensolchen Apparat ein ganz gleicher Versuch mit den identischen Mengenverhältnissen angesetzt. Hier ergab die Analyse folgendes Resultat:

II. 1. Analyse: 88,92 % CO_2, 6,18 % H, 0,77 % CH_4.
2. Analyse: 88,88 % CO_2, 6,45 % H, 0,71 % CH_4.

Mittel: 88,90 % CO_2, 6,32 % H, 0,74 % CH_4.
Summa = 95,96 %;
4,04 % eingedrungene Luft.

Selbstverständlich wäre es genauer gewesen, die Gase über Quecksilber aufzufangen, allein die dadurch bedingte Komplikation der Versuchsanordnung schien entbehrlich, da es uns,

wie gesagt, hauptsächlich darum zu tun war, die Natur des neben Kohlendioxyd gebildeten Gases zu kennen. Wie man sieht, besteht dasselbe im Durchschnitt zu 7% aus Wasserstoff, dem $^1/_{10}$ seiner Menge Methan beigemengt ist.

B. Fäulnis der Oxalessigsäure.

Versuch 1.

Der Gäransatz bestand hier aus einer in der Kälte bereiteten Lösung von 6,6 g Oxalessigsäure (malenoide Form) in 500 ccm Wasser, die unter starker Kühlung mit n-Kalilauge neutralisiert und mit Spuren der auch bei der Brenztraubensäure verwendeten Nährsalze versetzt worden war. Als Faulmischung dienten 10 ccm Fleischinfus, der 24 Stunden alt war. Das ganze Gemisch wurde auf 600 ccm aufgefüllt und 2 Wochen im Brutschrank aufbewahrt. Die Gasentwicklung war hier weit geringer und zog sich 14 Tage lang hin. Die Abgase wurden nach der bei Versuch 5 beschriebenen Anordnung in dem außerhalb des Thermostaten stehenden Azotometer gesammelt. Es zeigte sich, daß das von Kalilauge nicht absorbierte Gas (90 ccm) brennbar und der Hauptmenge nach Wasserstoff war. Die Fäulnislösung, in der mit Nitroprussidnatrium und Kalilauge keine Spur des Ausgangsmaterials mehr nachgewiesen werden konnte[1]), wurde unter Zugabe von 50 ccm 25%iger Phosphorsäure destilliert, wobei 15270 ccm Destillat mit einer Acidität = 41 ccm n-Natronlauge übergetrieben wurden. Die Darstellung der alkohollöslichen Natriumsalze aus dem mit Soda neutralisierten und eingedampften Destillat ergab 3,50 g Substanz.

α) Ameisensäurebestimmung.

0,2976 g rohes Natriumsalz enthielt 0,0501 g Natriumformiat = 16,83%.

β) Essigsäurebestimmung.

2,4020 g Natriumsalz lieferte nach Zerstörung der Ameisensäure 2,013 g Silbersalz. 0,1202 g Silbersalz ergab 0,0778 g Silber.

$CH_3.COOAg$ berechnet: 64,56% Ag,
gefunden: 64,72% Ag.

[1]) Eine Kontrolle mit antiseptisch angesetzter Oxalessigsäurelösung ergab nach 14tägigem Verweilen im Brutschrank noch deutliche Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Lauge.

Versuch 2.

Der Versuch wurde mit 6,6 g Oxalessigsäure genau unter den gleichen Bedingungen wiederholt, aber die Digestion im Brutschrank wurde nur auf eine Woche ausgedehnt. Nach dieser Zeit war die Nitroprussidnatriumreaktion bereits verschwunden.

Das Gärgemisch wurde in 2 Teile geteilt. Die eine Hälfte diente zur Bestimmung der flüchtigen Säuren in der gewohnten Weise (a), während in der anderen Hälfte auf etwa abgespaltene Oxalsäure gefahndet wurde (b).

a) Die Menge des Destillats aus phosphorsaurer Lösung betrug 7630 ccm, die eine Acidität von 19 ccm n-Natronlauge aufwiesen. Die Aufarbeitung ergab 1,606 g Natriumsalz, in denen 10,87% Natriumformiat, berechnet aus der Kalomelmenge, und 71,50% Natriumacetat, ermittelt aus der Menge des reinen Silberacetats, vorhanden war.

b) Die andere Hälfte wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, da möglicherweise wegen des vorhandenen Calciumchlorids in der alkalischen Lösung oxalsaurer Kalk ausgefallen sein konnte. Die Lösung wurde alsdann filtriert, blieb jedoch wegen des Bakteriengehaltes leicht getrübt. Sie wurde hierauf nach den Angaben von Autenrieth und Barth[1]) mit Chlorcalcium und Ammoniak im Überschuß versetzt und auf dem Wasserbade 1/2 Stunde leicht erwärmt. Der gut abgesetzte Niederschlag wurde am nächsten Tage auf einem Doppelfilter abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag löste sich nahezu klar in 25 ccm 15%iger Salzsäure. Die fünfmalige Ausschüttelung mit 200 ccm 3% Alkohol enthaltendem Äther lieferte einen Rückstand, der bei erneutem Zusatz von Calciumchlorid, Ammoniak und Essigsäure eine unwägbare Menge eines schwerlöslichen Kalksalzes gab.

Daraus geht hervor, daß eine nennenswerte Menge Oxalsäure nicht zugegen gewesen sein kann.

Die isolierten Essigsäuremengen, deren Bestimmung keineswegs quantitativ ist, zeigen auf alle Fälle, daß der Abbau der Brenztraubensäure und der Oxalessigsäure durch Fäulnis ein verhältnismäßig glatt und eindeutig verlaufender Vorgang ist.

---

[1]) S. Vorschrift in Neuberg, Der Harn, S. 274.

Ein einfacher Polarisationsapparat für Mikro- und Makrobestimmungen bei weißem Licht.

Von

C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die biochemische Analytik steht im Zeichen der Mikromethoden, eine Erscheinung, die dem Bedürfnis entspringt, die chemischen Untersuchungsverfahren der unendlich feineren mikroskopischen Methodik anzunähern.

Auch für die optischen Prüfungen sind bereits Mikromethoden angegeben, bezüglich deren auf die Veröffentlichungen von E. Fischer[1]) und J. Donau[2]) verwiesen sei.

Für die Mikropolarisation sind bisher wohl ausschließlich Apparate mit monochromatischem Licht verwendet worden, d. h. besonders lichtstarke Instrumente mit Kreisgradeinteilung. Nur an den besten Apparaten hat man Vorrichtungen zur Ausführung von Mikropolarisationen angebracht, und sie sind auch für die Ausführung der feinsten Bestimmungen unerläßlich.

In der Laboratoriumspraxis kommt es nun vielfach nicht auf die Erreichung höchster Genauigkeit der Ablesungen an, sondern mehr auf eine handliche und schnelle Möglichkeit der Ausführung. Insbesondere können für Untersuchungen von wäßrigen Lösungen, um die es sich zu allermeist handelt, Apparate mit einer weißen Lichtquelle Verwendung finden, die den Vorzug besitzen, auch bei gefärbten Flüssigkeiten eine ausreichende Durchsicht zu gestatten.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend habe ich die Firma Fr. Schmidt & Haensch in Berlin veranlaßt, einen einfachen Polarisationsapparat zu bauen, der den gedachten Zwecken gerecht wird.

Dieser Apparat besitzt eine Quarzkeilkompensation, die bei jeder weißen Lichtquelle benutzt werden kann, und er ist den

[1]) E. Fischer, Ber. 44, 129, 1911.

[2]) J. Donau, Arbeitsmethoden der Mikrochemie, S. 62. Franckhsche Verlagsbuchhandl. Stuttgart 1913.

Bedürfnissen der physiologisch-chemischen Praxis am meisten entsprechend, auf Traubenzucker geeicht. Der Apparat ist mit einer Einrichtung zur Mikro- und Makropolarisation versehen, wie dieselbe bei den Kreisapparaten eingeführt ist. Diese Vorrichtung besteht aus einem an vier Stellen durchbohrten Schieber, der am Polarisator angebracht ist. Dieser Schieber gestattet die Größe der Polarisatorblende bequem auf einen Durchmesser von 1, 2, 4 oder 5 mm zu bringen. Dadurch können die kleinsten Mengen von Zuckerlösungen, — in entsprechend enge Beobachtungsröhren gefüllt, — einwandsfrei auf ihre Drehung geprüft werden.

Um eine recht genaue Einstellung zu ermöglichen, ist der Polarisator mit einem Lippichschen Halbprisma und einem Glanschen Nicol, anstatt wie bisher mit einem sogenannten Halbschattenprisma, ausgestattet. Ferner ist am Analysator die direkte Ablesung durch eine feinere Teilung und größere Lupe auf 0,05 % gebracht worden, während früher nur 0,1 Ablesung möglich war. Der Meßbereich geht von — 8 bis + 10 % Traubenzucker.

Da der Apparat Makro- und Mikrobestimmungen zuläßt, so kann man durch Einfüllung ein- und derselben Zuckerlösung in gewöhnliche und kapillare Beobachtungsröhren leicht Kontrollbestimmungen zur Einübung vornehmen; man hat nur nötig, mit Hilfe des Schiebers die geeignete Blende einzuschalten.

Die Handhabung des Apparates ist so einfach wie bei den gewöhnlichen Harnpolarimetern.

Mit 0,1 bis 0,2 ccm Urin vermag man hier praktisch absolut exakte Zuckerbestimmungen auszuführen, und es bedarf kaum der Erwähnung, daß auch Aminosäuren, aliphatische Oxysäuren und dergl. mit dieser Apparatur optisch geprüft werden können. Die Einstellung erfolgt, wie erwähnt, scharf auf 0,05 % Traubenzucker; bei einiger Übung ist jedoch eine Schätzung auf 0,025 % leicht zu erreichen. Das ist eine Genauigkeit, die für weitaus die meisten Zwecke ausreicht.

Der Preis[1]) des sehr handlichen Apparates ist ein mäßiger, so daß auch ohne Anschaffung eines teuren Kreisgradapparates die Ausführung von Mikropolarisationen möglich ist.

[1]) Preis des Apparates ohne Röhren und Lampe M. 395.—.

Phytochemische Reduktionen. VIII.

Die Überführung des Formaldehyds in Methylalkohol.

Von

Carl Neuberg und Ernst Welde.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In einer Serie von Arbeiten konnten wir zeigen, daß eine Umwandlung aliphatischer und aromatischer Aldehyde durch Hefen in die entsprechenden Alkohole möglich ist.

Die Reaktion ist in der aliphatischen Reihe bis zum Heptylalkohol durchgeführt worden und konnte auch bei den aromatischen Aldehyden mit und ohne Seitenkette sowie bei ungesättigten Aldehyden verwirklicht werden.

Es scheint uns nun wichtig, auch das Anfangsglied der Reihe, den Formaldehyd, CH_2O, nach dieser Richtung hin zu prüfen. Denn vielfach verhalten sich die einfachsten Vertreter einer Gruppe chemisch wie physiologisch abweichend, und andererseits bietet die phytochemische Reduktion gerade des Formaldehyds ein besonderes Interesse wegen der vielfach angenommenen Bedeutung dieser Substanz für die synthetischen Prozesse in der Pflanze.

Wie wir schon früher[1]) kurz erwähnt haben, gelingt die Reduktion des Formaldehyds zu Methylalkohol mit Hilfe von gärender Hefe. Allein diese Umwandlung vollzieht sich keineswegs so glatt wie die Hydrierung der anderen Aldehyde. Der Grund hierfür ist gewiß in erster Linie in der besonderen Giftigkeit des Formaldehyds zu suchen. Hinzu kommen experimentelle Hindernisse, die sich für die Durchführung der

---

[1]) C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. 52, 498, 1913.

Versuche aus dieser Toxizität ergeben, sowie die Schwierigkeiten, die sich bei der genauen Bestimmung von wenig Methylalkohol neben wenig Äthylalkohol geltend machen.

Immerhin ist uns der sichere Nachweis der Methylalkoholbildung geglückt, indem wir etwa 15 % des Formaldehyds durch den Gärungsvorgang in Methylalkohol überführen konnten.

Wenn wirklich der Formaldehyd das erste Produkt der Assimilation darstellt, so darf man auch annehmen, daß außer der Verwertung durch Kondensation, die zu Zuckerarten führt, die Umwandlung in Methylalkohol von der Pflanze ausgeführt werden kann. Auf diese einfache Weise kann die Methylgruppe geschaffen werden, die für die zahlreichen physiologischen Alkylierungen notwendig erscheint.

Experimenteller Teil.

Da der käufliche wässerige Formaldehyd stets mehr oder minder große Mengen Methylalkohol enthält[1]), stellten wir uns zu unseren Versuchen zunächst methylalkoholfreie Formaldehydlösungen in folgender Weise dar:

140 g (= 1 Mol) reinstes Hexamethylentetramin (Urotropin „Schering")[2]) wurden in 3 l Wasser gelöst und die berechnete Menge (200 g) Schwefelsäure (spez. Gew. 1,84) unter Kühlung hinzugegeben; durch Einleiten von Dampf wurde dann etwa 1 l Flüssigkeit abdestilliert, die stark nach Formaldehyd roch, infolge mitgerissener kleiner Mengen Ameisensäure jedoch schwach sauer reagierte. Zur Reinigung wurde die Lösung mit etwas überschüssigem Calciumcarbonat geschüttelt und von diesem durch erneutes Dampfeinleiten abdestilliert. Wir erhielten so ca. 1 l völlig neutraler, wasserklarer Lösung, deren Formaldehydgehalt zu 4,0 % bestimmt wurde[3]).

Wir übergehen zahlreiche Vorproben und beschreiben die erfolgreichste Versuchsanordnung.

---

[1]) Duyk, Ch. C., 1901, II, 1370.

[2]) 2 kg Urotropin waren uns von der Chem. Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering) liebenswürdigerweise geschenkt worden.

[3]) Die Ausbeute betrug nur 22,2 % der Theorie; im schwefelsauren Rückstand verblieb noch beträchtlich Formaldehyd, der bei weiterem Abdestillieren aber stärker mit Ameisensäure verunreinigt war.

1.

Versuch mit lebender Hefe.

Eine Lösung von 500 g Rohrzucker in 5 l Leitungswasser wurde mit 500 g obergäriger Hefe (Rasse XII) in einer 10 l-Flasche in lebhafte Gärung versetzt. Zu diesem Gemische ließen wir dann durch einen Tropftrichter langsam unter Umschütteln 500 ccm obiger Formaldehydlösung (entsprechend also 20 g HCHO) hinzufließen. Die Kohlensäureentwicklung in der Gärflüssigkeit wurde zwar verlangsamt, blieb aber auch nach Zugabe der ganzen Formaldehydmenge schwach im Gange. Nach 3 tägigem Stehen im Brutschrank war die Gärung völlig erloschen, doch konnte — wie zu erwarten war — mittels Fehlingscher Lösung noch unveränderter Zucker nachgewiesen werden. Es wurden deshalb 150 g Hefe und 500 ccm Wasser von neuem zugesetzt, worauf eine deutliche Kohlensäureentwicklung wieder eintrat. Als nach weiteren 3 Tagen der Zucker noch nicht gänzlich umgesetzt war, wurden nochmals 150 g Hefe und 500 g Wasser zugegeben und der Ansatz weitere 3 Tage im Brutschrank belassen. Am 10. Tage wurde, obwohl immer noch unvergorener Zucker nachgewiesen werden konnte, die Flüssigkeit aus einem großen kupfernen Gefäß der Dampfdestillation unterworfen und unter sorgfältiger Kühlung 2 l Destillat aufgefangen. Die klare, nur ganz schwach nach Formaldehyd riechende Flüssigkeit wurde durch nochmalige Dampfdestillation auf 1 l Destillat gebracht, das mit ammoniakalischer Silberlösung wie auch mit fuchsinschwefliger Säure noch deutliche Aldehydreaktion zeigte. Zur Entfernung dieser unveränderten Formaldehydreste wurde die gesamte Lösung mit frisch gefälltem Silberoxyd (dargestellt durch Fällung von 85 g Silbernitrat in wäßriger Lösung mit einer unzureichenden Menge Natronlauge) 2 Stunden an einem langen Energie-Rückflußkühler gekocht. Als nach dieser Zeit eine Probe keine Spur einer Aldehydreaktion mehr zeigte, wurde unter Einleiten von Dampf etwa 1 l Flüssigkeit abdestilliert und diese durch erneute Destillation auf 500 ccm konzentriert. Das Übergegangene wies, wie wir uns nochmals überzeugten, keine Spur einer Aldehydreaktion auf und zeigte am Alkoholometer ein spezifisches Gewicht, wie es 30 $^0/_0$ igem Äthylalkohol entspricht; in 500 ccm Destillat waren also etwa 150 ccm durch Rohrzuckervergärung entstandener Äthylalkohol vorhanden.

Da eine physikalische oder chemische Trennung von Holzgeist und Äthylalkohol schwierig und unsicher ist, so erschien es uns am zweckmäßigsten, die beiden Alkohole durch Oxydation in die entsprechenden Aldehyde überzuführen, die ja nach einigen Methoden nebeneinander nachgewiesen werden können.

Zu diesem Zwecke wurden 50,0 ccm des wäßrig-alkoholischen Destillates mit 300 ccm $10^0/_0$iger Kaliumbichromatlösung versetzt, 100 ccm $20^0/_0$ige Schwefelsäure hinzugefügt und das Gemisch nach einstündigem Stehenlassen der Destillation unter Eiskühlung unterworfen.[1]) Die ersten 50,0 ccm der übergegangenen Flüssigkeit, die die Hauptmenge des Acetaldehyds enthalten, wurden verworfen. Mit Proben aus den danach übergehenden wäßrigen Fraktionen wurden die Grosse-Bohlesche[2]), die Robinesche[3]) und Schryversche[4]) Probe auf Formaldehyd angestellt und beide stark positiv befunden.

Qualitativ war damit also Methylalkohol in dem Destillat aus dem Formaldehydansatz zweifelsfrei nachgewiesen. Weiter gelang es, durch Vergleiche mit entsprechenden Testlösungen die Trillatsche und Grosse-Bohlesche Formaldehydprobe so zu kombinieren und anzuwenden, daß auch über die Menge des entstandenen Methylalkohols einigermaßen sichere Schlüsse möglich sind, wie wir später zeigen werden.

2.

Versuch mit abgetöteter Hefe.

500 g Rohrzucker wurden in 2300 ccm Wasser gelöst und zur Inversion mit 100 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure versetzt, zum Kochen erhitzt und dann mit 100 cm $^n/_{10}$-Natronlauge wieder neutralisiert. Gleichzeitig wurden 500 g Hefe XII mit 2500 ccm Wasser 1 Stunde lang auf 100^0 erhitzt. Beide Flüssigkeiten wurden noch heiß in einer 10 l-Flasche zusammengegeben und nach dem Abkühlen 500 ccm der erwähnten reinen $4^0/_0$igen Formaldehydlösung hinzugefügt. Nach 6tägigem Stehenlassen im Brutschrank wurde die Hefeaufschwemmung in genau der glei-

[1]) A. Trillat, C. r. 127, 232, 1898.

[2]) H. Grosse-Bohle nach der Beschreib. von H. Fincke, diese Zeitschr. 51, 260, 1913.

[3]) R. Robine, Ch. C. 1901, I, 1117 u. 1390.

[4]) S. B. Schryver, Ch. C. 1910, I, 1366.

chen Weise durch Destillation auf 1 Liter gebracht, wie bei Versuch 1 beschrieben. Diese wässerige Flüssigkeit roch äußerst stark nach Formaldehyd und verbrauchte beim Kochen unter Rückfluß fast 160 g Silberoxyd bis zum Verschwinden der Aldehydreaktionen. Es wurde dann 1 l Flüssigkeit abdestilliert und nach Zugabe von etwas $CaCO_3$ wie beim Versuch 1 auf 500 ccm gebracht. Das spezifische Gewicht war nahezu das des Wassers, da kein Alkohol durch Gärung entstanden war. 50,0 ccm der Lösung wurden wie vorhin beschrieben mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure behandelt, aber die mit verschiedenen Anteilen des Destillates angestellte Formaldehydprobe nach Grosse-Bohle blieb negativ.

Daraus folgt, daß die Reduktion des Formaldehyds zu Methylalkohol an die lebende Hefezelle geknüpft ist.

3.

Versuche zu einer quantitativen Ermittelung des gebildeten Methylalkohols.

Um einigermaßen Anhaltspunkte für eine Berechnung zu gewinnen, wieviel vom zugesetzten Formaldehyd unter dem Einfluß der gärenden Hefe zu Methylalkohol reduziert worden war, haben wir die nach Trillat und Grosse-Bohle kombinierte Probe auf Formaldehyd in folgender Weise zu einem colorimetrischen Vergleich der Versuchs- und Testlösungen herangezogen:

Lösung A: 500 ccm Destillat des erneut ausgeführten Versuchs 1, etwa 30 % Alkohol enthaltend, völlig frei von Formaldehyd.

Lösung B: Die 500 ccm Enddestillat des wiederholten Versuchs 2 wurden durch anreichernde Destillation konzentriert und mit so viel Sprit versetzt, daß 150 ccm einer gleichfalls rund 30 %igen Alkohollösung resultierten.

Testlösung C: 100 ccm Wasser + 50 ccm Äthylalkohol + 1,25 ccm Methylalkohol.

Testlösung D: 100 ccm Wasser, 50 ccm Äthylalkohol + 0,5 ccm Methylalkohol.

Testlösung E: 100 ccm Wasser + 50 ccm Äthylalkohol.

Je 50 ccm der Lösungen A bis E wurden nun in genau der gleichen Weise mit je 300 ccm einer 10 %igen Kalium-

bichromatlösung und 100 ccm 20 %iger Schwefelsäure versetzt, 1 Stunde stehen gelassen und dann in einem 1 l-Kolben mit absteigendem Schlangenkühler zum Sieden erhitzt. Das Destillat wurde in Meßzylindern aufgefangen, die nach je 50 ccm gewechselt wurden. Im ganzen wurden von jeder Lösung 5 mal 50 ccm Destillat gesammelt.

Von jeden 50 ccm Destillat wurden 2 mal je 10 ccm in angenähert gleich weiten Reagensgläsern angesetzt:

Serie I: 10 ccm Destillat + 2 ccm 12 %iger Salzsäure + 1 ccm Fuchsinschwefligsäurelösung.

Serie II: 10 ccm Destillat + 2 ccm 24 %iger Salzsäure + 1 ccm Fuchsinschwefligsäurelösung.

Die Ergebnisse waren folgende:

Lösung A:

Destillat . .	1	2	3	4	5
Serie I . .	rein blau	violett	stark violett	violett	schwach violett
Serie II . .	bläulich grün	violett	stark violett	violett	—
			Lösung B:		
Serie I . .	rein blau	farblos	ganz schwach violett	farblos	—
Serie II . .	bläulich grün	farblos	farblos	farblos	—
			Testlösung C:		
Serie I . .	rein blau	violett	stark violett	violett	violetter Schimmer
Serie II . .	hellbläulich grün	violett	stark violett	violett	farblos
			Testlösung D:		
Serie I . .	rein blau	farblos	violett	farblos	—
Serie II . .	bläulicher Schimmer	farblos	farblos	farblos	—
			Testlösung E:		
Serie I . .	indigoblau	farblos	farblos	farblos	—
Serie II . .	hellgrünlich blau	farblos	farblos	farblos	—

Ohne diesen Tabellen den Wert eines quantitativen Verfahrens beimessen zu wollen, können wir doch sagen, daß einmal in der Lösung A (Versuch mit lebender Hefe) soviel Methylalkohol enthalten ist, wie in der Testlösung C, die in 50 ccm 0,417 ccm

Methylalkohol enthält, daß also in den 500 ccm der Lösung A mindestens 4,1 ccm = 3,3 g Methylalkohol vorhanden sein müssen. Zweitens können wir von der Lösung B (Versuch mit abgetöteter Hefe) behaupten, daß in ihr eher weniger Methylalkohol vorhanden gewesen ist, als in der Testlösung D, d. h. weniger als 0,5 ccm oder = 0,4 g in den gesamten 150 ccm der Lösung B.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß sich angeblich [1]) Methylalkohol auch unter den natürlichen Gärungsprodukten gelegentlich findet. Es muß dahingestellt bleiben, ob ein solches Vorkommen auf eine Umwandlung zunächst auftretenden Formaldehyds durch die Hefen zurückgeführt werden kann.

---

[1]) J. Wolff, Ch. C. **1901**, I, 261; Th. v. Fellenberg, Ch. C. **18**, II, 310.

Phytochemische Reduktionen. IX.

Die Umwandlung von Thiosulfat in Schwefelwasserstoff und Sulfit durch Hefen.

Von

Carl Neuberg und Ernst Welde.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Seit langem ist bekannt, daß Schwefel von Hefe zu Schwefelwasserstoff reduziert werden kann, und die genauen Bedingungen für diese Reduktion sind durch die Arbeiten verschiedener Forscher festgelegt worden. Merkwürdigerweise liegen nur spärliche Angaben über das Verhalten von Hefen zu Thiosulfat vor, obgleich doch gerade das Schicksal des in dieser Verbindung eigentümlich gebundenen Schwefelatoms Interesse erwecken muß. M. W. Beijerinck[1]) scheint der erste gewesen zu sein, der eine Einwirkung von Hefe auf Thiosulfat bemerkt hat. Th. Bokorny[2]) beobachtete bei der Kultivierung von Hefe auf natriumthiosulfathaltigem Nährboden eine geringe, durch den Geruch eben nachweisbare Menge von Schwefelwasserstoff, war jedoch geneigt, diese auf die Wirkung beigemischter Bakterien zu beziehen. Eine ausführliche Untersuchung über diesen Gegenstand stammt von A. Kossowicz und W. Loew[3]), die folgendes festgestellt haben.

Züchtet man verschiedene Saccharomycesarten auf geeigneten zuckerhaltigen Nährlösungen, so findet man nach drei bis vier Wochen eine Assimilation zugesetzten Thiosulfats und eine titrimetrisch meßbare Abnahme dieses Salzes. Mit der Zunahme des Hefewachstums erfolgt gleichzeitig eine geringe

---

[1]) M. W. Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. II. Abt., 6, 205, 1900.

[2]) Th. Bokorny, ebenda 35, 141, 1912.

[3]) A. Kossowicz und W. Loew, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 2, 87, 1913.

Entwicklung von Schwefelwasserstoff, die nach einigen Tagen, in anderen Fällen nach Wochen, nachweisbar war. Die verschwundenen Mengen Thiosulfat waren nach dem Ausfall der Titration auch in den Fällen nicht groß, wo H_2S-Entwicklung deutlich war. Daß auch Hefepreßsaft aus Natriumthiosulfat Schwefelwasserstoff entbindet, geht aus einer Angabe von M. Hahn[1]) hervor.

Allem Anschein nach sind die früheren Versuche teils nur qualitativ, teils mit wachsender, aber mit nicht gärender Hefe[2]) bzw. mit nicht arbeitendem Hefepreßsaft angestellt worden. In unseren Versuchen über die Reduktionswirkung der Hefen auf organische Substanzen (Aldehyde, Nitro-, Nitrosokörper usw.) haben wir nun festgestellt, daß die Reduktionswirkung der lebenden Hefe besonders in gärenden Zuckerlösungen zum Ausdruck kommt; wir haben deshalb einige quantitative Versuche darüber für nötig erachtet, wie sich die Einwirkung arbeitender Hefen auf unterschwefligsaures Salz gestaltet.

Wie vorauszusehen war, ist der Einfluß bei gleichzeitiger Zuckervergärung wesentlich stärker und hat die Entwicklung eines nach einigen Minuten einsetzenden lebhaften Stromes von Schwefelwasserstoff zur Folge. Leitet man die Gärgase durch ein System von Waschflaschen mit geeigneten Waschflüssigkeiten (wie Kupfersulfat, Silbernitrat oder Cadmiumsulfat), die Schwefelwasserstoff, aber keine Kohlensäure binden, so kann man leicht die entwickelte Menge H_2S bestimmen. Wir konnten bei den im experimentellen Teil zu beschreibenden Anordnungen 15 bis 16% der theoretisch möglichen Menge Schwefelwasserstoff im Verlauf von 2 bis 4 Tagen in gasförmigem Zustande erhalten[3]).

Diese Berechnung ist unter der Annahme erfolgt, daß der Schwefelwasserstoff aus dem angewendeten Natriumthiosulfat tatsächlich durch einen Reduktionsvorgang im Sinne der Gleichung:

$$Na_2S_2O_3 + H_2 = H_2S + Na_2SO_3$$

[1]) Buchner-Hahn, Zymasegärung, S. 341, 1903.

[2]) Kossowicz und Loew (l. c.) geben ausdrücklich an, daß keine sichtbare CO_2-Entwicklung stattfindet.

[3]) Es dürfte möglich sein, durch erneuten Zusatz von Hefe und Zucker zu den ausgegorenen Thiosulfatansätzen die Ausbeute zu steigern.

hervorgegangen ist, und nicht auf Kosten einer einfachen Spaltung im Sinne der Formulierung:

$$Na_2S_2O_3 + H_2O = Na_2SO_4 + H_2S.$$

Letztere hätte keinerlei Interesse geboten, während die erst genannte Bildungsweise den Vorgang in volle Analogie zu den übrigen phytochemischen Reduktionen setzt.

Daß in der Tat die erste der genannten beiden Möglichkeiten, eine wirkliche Reduktion, vorliegt, geht aus dem Umstand hervor, daß wir im Gärgut Natriumsulfit, Na_2SO_3, ganz scharf nachweisen konnten, während Sulfat wie in den Züchtungsversuchen von Kossowicz und Loew fehlte.

Schließlich wurde noch durch analytische Kontrollen sichergestellt, daß in der durch die Gärungsgase in den Vorlagen erzeugten Fällung wirklich reines Schwefelsilber vorlag.

Freilich entwickelt sich Schwefelwasserstoff auch in solchen Ansätzen, die ohne Zugabe von Zucker angestellt wurden. Die Menge des hierbei freiwerdenden Schwefelwasserstoffs ist jedoch erheblich geringer. Der Reaktionsverlauf ist der gleiche. Die Mengen des entwickelten H_2S schwanken nicht unerheblich, was man mit der wechselnden Stärke der Selbstgärung bei den angewandten Hefen ungezwungen in Verbindung bringen darf. In den Ansätzen, wo Hefe ohne Zucker mit Thiosulfat digeriert wird, bleibt auch bei mehrtägigem Verweilen im Brutschrank die Schwefelwasserstoffbildung so gering, daß es in den vorgelegten Absorptionsflüssigkeiten höchstens zu einer Trübung, aber zu keiner Ausfällung von Schwefelmetall kommt. Diese tritt erst ein, wenn man einen Kohlensäurestrom, der den Schwefelwasserstoff mit sich reißt, durch die Apparatur hindurchschickt.

Der letztgenannte Umstand machte Kontrollen darüber notwendig, ob die Kohlensäure trotz ihres schwachen Säurecharakters ev. in Gegenwart von Alkohol aus einer Thiosulfatlösung Schwefelwasserstoff zu entbinden imstande sei. Die Versuche zeigten, daß keine wahrnehmbare Menge H_2S selbst bei langem Durchleiten von CO_2 durch eine Natriumthiosulfatlösung frei wird.

Daß diese ganzen Vorgänge mit Lebensvorgängen der Hefe zusammenhängen, ging schließlich daraus hervor, daß

durch Kochen abgetötete Hefe keine merkliche Einwirkung auf Thiosulfat ausübt.

Übrigens ist öfter schon rein äußerlich ein Unterschied im Aussehen zwischen den Ansätzen mit gärender Hefe[1]) und den zuckerfreien Ansätzen wahrzunehmen. Die erstgenannten behalten ihr gewöhnliches Aussehen, während die abgetötete oder zuckerfrei digerierte Hefe eine schiefergraue Färbung annimmt[2]), die wohl auf die Bildung von Schwefeleisen zurückzuführen ist.

Aus allem geht hervor, daß arbeitende Hefen — benutzt wurden eine obergärige und eine untergärige Rasse — eine kräftige Reduktion hinzugesetzten Thiosulfats zu Schwefelwasserstoff und Bildung von Sulfit bewirken.

Experimenteller Teil.

Versuch 1.

Zu einer Suspension von 250 g Hefe XII in der Lösung von 250 g Rohrzucker in 2300 ccm Wasser wurde nach dem Einsetzen der Gärung eine Lösung von 24,8 g Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3 + 5H_2O$) in 200 ccm Wasser gegeben. Das Gärgefäß befand sich hier wie in allen folgenden Versuchen gemäß der mehrfach von uns beschriebenen Versuchsanordnung im Brutschrank und war durch ein Gasentbindungsrohr mit drei Borkschen Gaswaschflaschen verbunden, die je mit 100 ccm 5%iger Silbernitratlösung gefüllt waren. Durch den doppelt durchbohrten Gummistopfen des im Brutschrank befindlichen Gärgefäßes führte ein zweites Glasrohr bis auf den Boden der Flasche; dasselbe war zunächst durch einen Gummischlauch mit Quetschhahn abgeschlossen. Etwa 10 Minuten nach dem Zusatz des Thiosulfats trat in der ersten Vorlage eine gelbe Färbung auf und rasch erfolgte eine Abscheidung von Flocken schwarzen Schwefelsilbers. Nach 3 Tagen wurde 6 Stunden lang reine Kohlensäure nach Öffnung des Quetschhahnes durch das bis zum Boden reichende Rohr in langsamem Strome durch das System geleitet.

Das fast völlig in der ersten und zum geringen Teile in

[1]) Wir verdanken auch dieses Mal die Hefen dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.

[2]) Dieses Verhalten tritt namentlich bei der obergärigen Hefe XII deutlich zutage.

der zweiten Gaswaschflasche abgeschiedene Schwefelsilber wurde abfiltriert, mit Wasser und dann mit Alkohol ausgewaschen und nach dem Trocknen gewogen. Erhalten wurden 3,66 g Ag_2S gleich rund 15% der Theorie.

In dem vom Hefesatz abfiltrierten Gärgute war unverändertes Thiosulfat durch die Salzsäure-, die Eisenchlorid- und die Silbernitratprobe nachweisbar. In einer völlig klar filtrierten Probe erzeugte Bariumchlorid nur den Hauch einer Fällung, die bei mehrstündigem Stehen zunahm und in verdünnter Salzsäure nahezu völlig löslich war, demnach höchstens zu einem geringen Teil aus Bariumsulfat bestand.

Dagegen war in der filtrierten Lösung des Gärgutes ohne weiteres die Gegenwart von Sulfit nachweisbar. Schon 2 ccm der Lösung ergaben mit etwas Nitroprussidnatriumlösung und mit Zinksulfat eine sehr deutliche Rosafärbung und auf Zusatz von gelbem Blutlaugensalz einen roten Niederschlag.

In solchen Gärungsflüssigkeiten gelingt nach unseren Erfahrungen der Nachweis der schwefligen Säure am besten, wenn man nach Zugabe der Nitroprussidnatriumlösung Zinksulfat in Substanz einträgt, und falls schwach saure Reaktion durch die bei der Gärung entwickelten Säuren besteht, nunmehr mit Natriumbicarbonat abstumpft. Bei voraufgegangener Neutralisation mit doppeltkohlensaurem Natrium fiel die Probe mehrfach weniger schön aus, vielleicht infolge Carbaminatbildung mit stickstoffhaltigen Bestandteilen der Lösung.

Versuch 2.

25 g Hefe XII wurde mit einer Lösung von 25 g Rohrzucker in 230 ccm Wasser übergossen und alsbald mit einer Lösung von 2,5 g Natriumthiosulfat in 20 ccm Wasser versetzt. Außerhalb des Brutschrankes waren in den Absorptionsgefäßen 4 g Silbernitrat in 80 ccm Wasser vorgelegt. Nach 3tägiger Digestion und 12stündiger Durchleitung von Kohlensäuregas wurden 0,39 g ausgefälltes Ag_2S zur Erwägung gebracht. Das sind etwa 16% der Theorie.

Versuch 3.

250 g Hefe XII wurden mit 2500 ccm Wasser durchgeschüttelt und mit 250 g Rohrzucker versetzt. Sobald der-

selbe in Lösung gegangen war, wurden 24,8 g krystallisiertes unterschwefligsaures Natrium hinzugesetzt. Die drei Vorlagen wurden hier mit je 100 ccm 4%iger Silbernitratlösung beschickt. Nach 10 Minuten begann in der ersten Vorlage die Trübung und nach 20 Minuten die erste Abscheidung von Schwefelsilber. Nach 4tägigem Stehen und viertelstündigem Durchleiten von Kohlendioxyd waren 3,45 g Silbersulfid abgeschieden, entsprechend 14% der theoretisch möglichen Menge. Im klar filtrierten Gärgut war reichlich Natriumsulfit nachweisbar.

Versuch 4.

Die Suspension von 250 g Hefe XII in 2500 ccm Wasser wurde mit 24,8 g Natriumthiosulfat versetzt und im übrigen genau wie das Gärungsgemisch des Versuches 3 behandelt. Der Versuch wurde gleichzeitig und im selben Brutschrank angestellt. Zum Schlusse war in den Vorlagen kein Silbersulfid ausgefallen; es trat erst auf, als Kohlensäure 90 Minuten lang durch das System hindurchgeleitet wurde. Die abgeschiedene Menge Silbersulfid belief sich auf 0,72 g = rund 3% der Theorie.

Im klaren Filtrat des tiefgrauen Gärungsrückstandes war reichlich unverändertes Thiosulfat nachweisbar, während die Sulfitreaktion nur schwach ausfiel. In diesem ohne Zucker durchgeführten Versuche bleibt deutlich die Menge des entwickelten Schwefelwasserstoffs sowie die der entstandenen schwefligen Säure zurück.

Versuch 5.

250 g Hefe XII wurden mit 1250 ccm Wasser im siedenden Dampfbad eine Stunde lang gekocht. Ferner wurden 250 g Rohrzucker in 1150 ccm Wasser mit 50 ccm n-Schwefelsäure auf dem Wasserbade invertiert und mit 50 ccm n-Natronlauge sodann neutralisiert. Nach dem Erkalten wurden die Zucker- und Hefeabkochungen gemischt und mit 24,8 g Thiosulfat sowie mit etwas Toluol versetzt. Vorgelegt wurden 100 ccm 5%ige Silbernitratlösung, die sich von selbst nicht im geringsten trübten. Nach 3 Tagen wurde 6 Stunden lang Kohlendioxyd hindurchgeleitet, wodurch eine Trübung in der Vorlage und schließlich Ausfällung von 0,001 g Ag_2S hervorgerufen wurde.

Versuch 6.

100 g Hefe K[1]) wurde mit einer Lösung von 100 g Rohrzucker in 1000 ccm Wasser versetzt. Sobald lebhafte Gärung eingetreten war, wurden 10,0 g fein gepulvertes Natriumthiosulfat hinzugefügt. In der ersten Vorlage trat nach 5 Minuten eine schnell sich vermehrende Ausscheidung von Schwefelsilber ein. Nach 24 stündiger Versuchsdauer, wo aller Zucker vergoren war, wurde 20 Minuten lang Kohlendioxyd hindurchgeleitet und 0,50 g Silbersulfid, = 5 % der Theorie, zur Wägung gebracht.

Es wurden dann noch 100 g Hefe K, 1000 ccm H_2O und 100 g Rohrzucker zu dem alten Gärgut gefügt. Schnell setzte neue Gärung und in den ausgewechselten Vorlagen eine zweite Fällung von Ag_2S ein. Nach 24 Stunden wurde 20 Minuten CO_2 hindurchgeleitet und noch 0,53 g Silbersulfid erhalten. Im ganzen waren also 10 % der möglichen Menge[2]) H_2S abgespalten. Im klar filtrierten Gärgut war Natriumsulfit deutlich nachzuweisen.

Versuch 7.

200 g Hefe K wurde allein mit 2000 ccm Wasser und 20 g Natriumthiosulfat gleichzeitig mit dem Ansatz des Versuchs 6 im Brutschrank digeriert. Es wurde sofort mit einer Einleitung von Kohlensäure begonnen, die 30 Minuten lang fortgesetzt wurde und baldige Trübung der ersten Vorlage zur Folge hatte. Nach 1 tägigem Verweilen bei 37° wurde nochmals eine Stunde lang Kohlendioxyd hindurchgeleitet. Zur Abscheidung gelangten nunmehr 0,11 g Silbersulfid.

Eine erneute Zugabe von 100 g Hefe K und 1000 ccm Wasser hatte bei entsprechender Verarbeitung nach 24 Stunden weitere Abscheidung von 0,20 g Ag_2S zur Folge. Die Gesamtausbeute an H_2S belief sich hier also auf 1,6 % der Theorie. Sie blieb gering, obgleich bei der CO_2-Durchleitung gleich zu Anfang schnell etwas Schwefelwasserstoff überging.

---

[1]) Die untergärige Hefe K vergor äußerst stürmisch und erlaubte wegen des starken Schäumens einen Ansatz mit nur 100 g Zucker usw., während in der Kontrolle ohne Zucker die doppelten Mengen angewendet wurden.

[2]) Im Vergleich mit Versuch 7 muß die Menge H_2S verdoppelt werden, da bei der Anordnung des Versuchs 7 die doppelte Menge Natriumthiosulfat angesetzt worden ist.

Versuch 8

ist eine genaue Wiederholung des Versuchs 5 unter Anwendung der untergärigen Hefe K. Das Ergebnis war eine Ausscheidung von 0,003 g Ag_2S. Auch hierbei handelt es sich demnach nur um Spuren H_2S, welche die gekochte Hefe entwickeln kann.

Versuch 9.

Um sicher zu sein, daß die in den Vorlagen gebildete Fällung wirklich aus Schwefelsilber bestand, wurde in mehreren Fällen das abgeschiedene Silbersulfid nach H. Salkowski[1]) analysiert.

a) 0,3110 g Substanz (Silberfällung des Versuchs 3) lieferten 0,2704 g Ag.

b) 0,3983 g Substanz (Silberfällung des Versuchs 4) lieferten 0,3480 g Ag.

Gef. a) 86,94 % Ag; b) 87,41 % Ag; Ag_2S, ber. 87,09 % Ag.

Versuch 10.

Die Lösung von 10 g Natriumthiosulfat in 1000 ccm Wasser wurde mit 100 ccm absolutem Alkohol versetzt. Bei 60stündiger Durchleitung eines Kohlensäurestroms durch den bei 38° im Brutschrank aufbewahrten Kolbeninhalt trat keine Trübung des letzteren ein und im vorgelegten Silbernitrat schied sich kein Niederschlag ab.

Demnach kann die Gärungskohlensäure keinen Einfluß auf die Schwefelwasserstoffbildung aus Thiosulfat unter den gewählten Bedingungen haben.

---

1) H. Salkowski, Ber. 26, 2497, 1893.

Weiteres über die Fällung von Aminosäuren mit Mercuriacetat und Soda.

Von

C. Neuberg und Joh. Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie zu Berlin-Dahlem.)

Vielfach macht sich das Bedürfnis nach einem Fällungsmittel für Aminosäuren geltend, das diese Gruppe von Substanzen aus ihren Lösungen in ähnlicher Weise zu fällen vermag wie etwa Bleiessig und Ammoniak die Zuckerarten. Ein solches Reagens haben wir[1]) vor einiger Zeit in der gemeinsamen Einwirkung von Mercuriacetat und Soda auf die Aminosäuren gefunden. In wäßriger Lösung, und noch vollständiger auf Zugabe von Alkohol, werden die Aminosäuren durch das genannte Fällungsmittel als schwer lösliche Quecksilberverbindungen niedergeschlagen. Dieselben sind von den gewöhnlichen, zum Teil recht leicht löslichen Quecksilbersalzen der Aminosäuren ganz verschieden; sie müssen nach unseren früheren Darlegungen als Quecksilberverbindungen von Carbaminsäuren aufgefaßt werden, die durch Addition von Soda an die eigentlichen Aminosäuren entstehen. Für diese Auffassung war auch besonders das Verhalten des Glucosamins maßgebend, das gleichfalls eine entsprechende Quecksilberverbindung bildet[2]). Durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff liefern diese Substanzen unter Abspaltung von Kohlensäure die ursprünglichen Aminokörper zurück.

Dies Verfahren, das sich durch große Einfachheit auszeichnet, findet eine nützliche Anwendung in den Fällen, wo es sich um eine Abscheidung von Aminosäuren aus Lösungen

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, **40**, 498, 1912.

[2]) Jüngst hat P. Karrer (Ber. 47, 2275, 1914) die Bildung von Carbaminsäurederivaten von m-Diaminen beschrieben, die ebenfalls durch einfachen Zusatz von Soda bzw. Natriumbicarbonat entstehen.

handelt, die anorganische Salze oder Zuckerarten enthalten, im übrigen aber von höheren Eiweißspaltungsprodukten frei sind. So hat jüngst mit Hilfe dieser Methode Abderhalden[1]) die normalen, im Blute vorkommenden Aminosäuren isolieren können, während ihn die üblichen anderen Verfahren hierbei nicht zum Ziele führten.

Es schien uns nun wichtig, festzustellen, ob auch die den Aminosäuren nahe stehenden einfachen Peptide und weiterhin Peptone überhaupt durch unser Reagens gefällt werden. Das ist in der Tat der Fall. Leucylleucin, Glycyltryptophan, Glycyltyrosin, Seidenfibroinpepton sowie Wittesches Pepton werden nahezu vollständig aus ihren Lösungen gefällt, so daß die Methode auch zur Abscheidung dieser Körper Anwendung finden kann; die Rückgewinnung der genannten Ausgangsmaterialien aus den Quecksilberverbindungen ist gleichfalls möglich.

Experimentelles.

a) 1,0 g lufttrockenes Leucylleucin wurde mit 60 ccm heißem Wasser gelöst und abwechselnd mit 10%iger Natriumcarbonatlösung und 25%iger Mercuriacetatlösung versetzt, bis der entstandene weiße Niederschlag einen gelbroten Farbenton (von ausgefallenem HgO) annahm. Dann wurden 180 ccm Alkohol hinzugesetzt und die entstandene Fällung nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abfiltriert und gründlich mit 66%igem Alkohol nachgewaschen. Das gesamte Filtrat wurde mit Schwefelsäure schwach angesäuert und auf dem Wasserbade eingeengt. Im Rückstand wurde der vorhandene Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Es waren 0,0077 g N zugegen.

Der Quecksilberniederschlag wurde mit 400 ccm Wasser angerieben und mit Schwefelwasserstoff anfangs in der Kälte, dann in der Wärme völlig zersetzt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid wurde im Vakuum eingeengt, wobei sich noch kleine Mengen Schwefelquecksilber und Schwefel abschieden. Die davon abfiltrierte Flüssigkeit lieferte beim Einengen auf ein kleines Volumen 0,9 g lufttrockenes Leucylleucin zurück.

b) 1,0 g Glycylglycin wurde in analoger Weise mit Quecksilberacetat und Soda unter Zugabe von Alkohol behandelt. Aus der Quecksilberfällung wurden 0,88 g Glycylglycin in reiner

[1]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 478, 1913.

Form zurückgewonnen, während im Filtrat 0,0098 g N gelöst geblieben waren.

c) 0,6 g Glycyltryptophan wurden in 60 ccm warmem Wasser gelöst und mit Soda plus 25 $^0/_0$iger Mercuriacetatlösung sowie schließlich mit 60 ccm Alkohol versetzt. Der Fällung entgingen nur 0,0037 g N. Aus dem Hg-Niederschlag konnten 0,5 g reines Glycyltryptophan nach der Zerlegung mit Schwefelwasserstoff zurückgewonnen werden.

d) 0,5 g Glycyl-l-tyrosin wurden durch Quecksilberacetat, Soda und Alkohol so vollständig gefällt, daß nur 0,0050 g N in Lösung blieben und fast 0,5 g Glycyltyrosin regeneriert werden konnten.

e) 1,0 g Seidenfibroinpepton mit einem Gehalt von 16,08 $^0/_0$ N wurde aus wäßriger Lösung mit Mercuriacetat und Soda ausgefällt und dann mit der Hälfte des Volumens an Alkohol versetzt. Im Filtrat verblieben 0,0077 g N = 4,8 $^0/_0$ des vorhandenen Stickstoffs. Auch hier ist die Ausfällung, wie ersichtlich, recht vollständig, und aus dem zersetzten Hg-Niederschlag wurde eine Peptonlösung zurückgewonnen.

f) 1,0 g Pepton-Witte mit einem Gehalt von 14,96 g N wurde in der beschriebenen Weise mit dem Fällungsmittel behandelt. Der Quecksilberniederschlag ergab nach Zersetzung mit H_2S eine Peptonlösung. Ungefällt blieben 0,0065 g N = 4,3 $^0/_0$ vom Stickstoff des Ausgangsmaterials.

Die mitgeteilten Daten zeigen, daß auch für die Molekülverbände verschiedener Aminosäuren unser Quecksilberacetat-Soda-Reagens[1]) ein ausgezeichnetes Fällungsmittel darstellt.

---

[1]) Die Wahl des essigsauren Quecksilbers dürfte im allgemeinen aus den früher auseinandergesetzten Gründen der Benutzung andrer Quecksilbersalze vorzuziehen sein. Daß einzelne Aminosäuren durch verschiedene Quecksilbersalze niedergeschlagen werden, ist längst bekannt. So fallen Tryptophan durch Mercurisulfat (Hopkins), Cystin und Histidin durch Sublimat (Baumann, Mauthner, Kossel, S. Fränkel); setzt man bei der üblichen Titration des Harnstoffs mit schwach saurem Mercurinitrat einzelne Aminosäuren hinzu, so können diese nach E. Salkowski (Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 55) in verschiedenem Grade mitgerissen werden. Jedoch erst die gemeinsame Anwendung von Mercuriacetat plus Soda stellt ein allgemeines Fällungsmittel für Aminosäuren und ihre Verbände dar.

Das Verhalten der α-Ketosäuren zu Mikroorganismen. II.
Die Fäulnis von α-Ketobuttersäure.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In der I. Mitteilung über diesen Gegenstand[1]) konnten wir an den Beispielen der Brenztraubensäure und der Oxalessigsäure zeigen, daß diese Substanzen durch die Erreger der Fäulnis in charakteristischer Weise umgewandelt werden. Unter Entwicklung von Kohlensäure und Wasserstoff werden sie zu der zugehörigen Fettsäure abgebaut; daneben entsteht stets auch Ameisensäure. Der Menge und dem Wesen nach bildet die Fettsäure das hauptsächliche Abbauprodukt. So vollzieht sich für die Brenztraubensäure die Umwandlung durch Fäulnis vornehmlich im Sinne folgender Formulierung:

$$CH_3.CO.COOH + H_2O = CH_3.COOH + CO_2 + H_2.$$

Wie wir früher erwähnt haben[1]), ist es durchaus möglich, daß die desaminierende Fäulnis der Aminosäuren, ähnlich anderen Abbaureaktionen dieser Substanzen, über die Stufe der α-Ketosäuren führt. Zur weiteren Prüfung dieses Gedankens scheint es uns notwendig, noch andere α-Ketosäuren auf ihr Verhalten bei der Fäulnis zu untersuchen.

Wir wählten als ein neues Beispiel[2]) die α-Ketobuttersäure und können bezüglich der experimentellen Einzelheiten wie der theoretischen Gesichtspunkte auf unsere früheren Angaben über die Fäulnis der Brenztraubensäure[1]) verweisen.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 90, 1914.

[2]) Schon jetzt können wir mitteilen, daß die Fäulnis von Methyläthylbrenztraubensäure d-Valeriansäure ergibt (vgl. diese Zeitschr. 67, 32, 1914).

Auch bei der α-Ketobuttersäure, $CH_3.CH_2.CO.COOH$, findet der Abbau zur nächst niedrigen Fettsäure, zur Propionsäure, $CH_3.CH_2.COOH$, statt. Daneben entsteht ebenfalls etwas Ameisensäure, und es entweicht neben Kohlendioxyd Wasserstoffgas.

Die beiden Gase sowie die Ameisensäure entwickeln sich langsam und verhältnismäßig in geringer Menge, und auch die Ausbeute an Propionsäure ist keine überaus reichliche. Es dauert etwas mehr als 14 Tage, bis in der Faulmischung keine α-Ketobuttersäure mehr nachweisbar ist. Ein Teil der letzteren dürfte wohl in anderer Richtung umgewandelt werden. Das etwas abweichende Verhalten der α-Ketobuttersäure kann man mit dem Umstande in Verbindung bringen, daß die ihr entsprechende α-Amino-n-buttersäure keinen regelmäßigen Zellbaustein bildet und die Ketosäure infolgedessen eine zellfremde Substanz sein dürfte.

Immerhin gelang es uns, aus α-Ketobuttersäure etwa 20 % der theoretisch möglichen Menge Propionsäure zu gewinnen.

Experimentelles.

Bearbeitet von J. Jamakawa.

Versuch 1.

10 g α-Ketobuttersäure wurden mit 800 ccm Leitungswasser sowie mit Sodalösung bis zur gerade alkalischen Reaktion auf Lackmus versetzt. Hierzu wurden einige Krystalle von Ammoniumsulfat, Kaliumnitrat, Dikaliumphosphat, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumsulfat sowie 1 Tropfen Eisenchloridlösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf 1 l aufgefüllt und mit 10 ccm Fäulnismischung geimpft, die 24 Stunden alt war. Beim Aufbewahren im Brutschranke war nur eine schwache Gasentwicklung bemerkbar, und unveränderte Ketobuttersäure war erst nach 18 Tagen nicht mehr erkennbar[1]). Alsdann wurde das Gemisch mit 25 %iger Phosphorsäure bis zur stark sauren Reaktion auf Kongo versetzt und mit Wasserdampf so lange destilliert, wie eine sauer reagierende Flüssigkeit überging. Die Menge des Destillats belief sich auf 12 940 ccm,

---

[1]) Mit m-Nitrophenylhydrazinacetat blieb dann jede Fällung bzw. Trübung einer klar filtrierten und essigsauer gemachten Probe des Fäulnisgemisches aus (s. S. 126).

deren Acidität nach Bestimmung an einem aliquoten Teil gleich 49,05 ccm n-Natronlauge war.

Die mit Sodalösung neutralisierte Hauptmenge wurde auf dem Wasserbade zur Krystallisation eingedampft und lieferte nach mehrfacher Extraktion mit siedendem 95%igem Alkohol 3,35 g trockene, in heißem Weingeist lösliche Natriumsalze. (Der in Alkohol unlösliche Anteil der Natriumsalze ist nicht weiter untersucht worden; hauptsächlich lag Na_2CO_3 vor.)

Die konzentrierte wäßrige Lösung der rohen Natriumsalze ergab mit Silbernitrat eine weiße Fällung, die sich jedoch bald schwärzte und dadurch einen Gehalt an Ameisensäure zu erkennen gab.

α) Ameisensäurebestimmung[1]).

0,5232 g Natriumsalz ergaben 0,0924 g HgCl = 0,0090 g Ameisensäure.

β) Propionsäurebestimmung[1]).

2,7262 g Natriumsalz lieferten nach Zerstörung des Formiats 3,4864 g Silbersalz = 1,425 g Propionsäure.

Die Silberbestimmung ergab folgendes:

0,1560 g Silbersalz lieferten 0,0926 g = 59,36% Ag. Für propionsaures Silber, $CH_3.CH_2.COOAg$, berechnet sich 59,65% Ag.

Versuch 2.

10,0 g α-Ketobuttersäure wurden in der zuvor erwähnten Weise mit Soda neutralisiert und nach Zugabe der Nährsalze auf 1000 ccm aufgefüllt. Die Mischung wurde dann mit 2 g reinem Calciumcarbonat sowie mit 10 ccm Faulflüssigkeit versetzt und in den Brutschrank gebracht. Das Gefäß wurde in der früher[2]) von uns beschriebenen Weise mit einem Azotometer verbunden, das außerhalb des Wärmekastens stand. Alsdann wurde 20 Minuten lang Kohlensäure durch die ganze Apparatur geleitet.

Im Laufe von 16 Tagen sammelte sich im Eudiometer reichlich Gas; es wurde alsdann wiederum CO_2 durch das System geschickt. Von dem aufgefangenen Gas waren 94,7 ccm durch 33%ige Kalilauge nicht absorbierbar. Sie waren brennbar und verpufften nach Beimengung von Sauerstoff.

---

[1]) Bezüglich der Methodik siehe diese Zeitschr. 67, 95, 1914.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 97, 1914.

Das im Gärgefäß zurückgebliebene Fäulnisgemisch wurde genau wie bei Versuch 1 mit Phosphorsäure angesäuert, mit Dampf destilliert und weiter verarbeitet. Die Menge des durch 10 malige Extraktion des rohen Natriumsalzes erhaltenen alkohollöslichen Gemisches von Natriumsalzen betrug 4,05 g.

α) Ameisensäurebestimmung.

0,7050 g Natriumsalz ergaben 0,1062 g HgCl = 0,0103 g Ameisensäure.

β) Propionsäurebestimmung.

3,250 g Natriumsalz lieferten nach Entfernung des Formiats 4,446 Silbersalz (gleich 1,814 g Propionsäure). Letzteres wies einen Ag-Gehalt von 60,38 % Ag auf.

Wie ersichtlich, ist der Silbergehalt ein wenig zu hoch befunden, ein Umstand, der auf eine Beimengung schließen ließ. Wir nahmen deshalb eine weitere Reinigung des Silbersalzes in folgender Weise vor:

Wir lösten die gesamte Menge in heißem Ammoniak, wobei ein wenig einer dunkeln Masse ungelöst blieb. Die ammoniakalische Lösung wurde alsdann stark phosphorsauer gemacht und abermals mit Wasserdampf destilliert. Das Übergegangene wurde mit Soda neutralisiert und zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit Alkohol mehrfach extrahiert und das Gemisch der Alkoholauszüge verdampft. Die filtrierte Lösung des Rückstandes reagierte schwach alkalisch und wurde mit Salpetersäure genau neutralisiert. Auf Zusatz von 50 %igem Silbernitrat schied sich nunmehr ein Silbersalz ab, das nach dem Auswaschen gut für Silberpropionat stimmende Werte ergab.

0,1083 g Substanz lieferten 0,0647 g Ag.

$CH_3.CH_2.COOAg$: Ber. Ag = 59,65; gef. Ag = 59,74 %.

Versuch 3.

Eine Lösung von 1 g α-Ketobuttersäure in 100 ccm ausgekochtem Wasser wurde für sich, zusammen mit den Ansätzen 1 und 2, im Brutschrank belassen. Nach 16 Tagen war keine Abnahme der α-Ketobuttersäure zu konstatieren.

Mit Sicherheit ergibt sich also, daß α-Ketobuttersäure durch Fäulnis unter Verkürzung der Kohlenstoffkette in Propionsäure übergeführt werden kann.

Anhang.

α-Ketobuttersäure-m-nitrophenylhydrazon.

Zum Nachweis der α-Ketobuttersäure ist mit Vorteil die Verbindung der Säure mit m-Nitrophenylhydrazin verwendet. Das in essigsaurer Lösung der Komponente fast momentan entstehende Hydrazon bildet, aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, hellgelbe abgeplattete Nadeln vom Schmelzpunkt 189 bis 190° (bei schneller Erhitzung).

0,1486 g Substanz gaben 23,2 ccm N (761, 20,5°).

$C_{10}H_{11}N_3O_4$ (237): Ber. N = 17,72 %; gef. N = 17,87 %.

Zum Nachweis von unveränderter α-Ketosäure im Fäulnisgemisch verfährt man so, daß man 5 ccm mit Essigsäure ansäuert, filtriert und mit m-Nitrophenylhydrazinacetatlösung aufkocht. Falls die Säure noch vorhanden ist, fällt sofort oder nach einiger Zeit ein gelbes Krystallmehl aus.

Einfache Umlagerungen in der Reihe der Glykole und ihrer stickstoffhaltigen Abkömmlinge. I.

Die Bildung von Acetaldehyd aus Äthylenglykol, Äthylendiamin, Colamin, Serin und Isoserin.

Von

C. Neuberg und B. Rewald.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Entstehung der Methylgruppe ($—CH_3$) aus primären und sekundären Alkoholgruppen ($—CH_2.OH$, $=CH.OH$) ist ein Vorgang, der bei einer großen Anzahl biochemischer Reduktionen zutage tritt und bis vor kurzem der Erklärung ganz besondere Schwierigkeiten geboten hat. Die Entstehung der Milchsäure im Tier- und Pflanzenkörper, die Bildung des Äthylalkohols und seiner Homologen, die Produktion von Buttersäure und Valeriansäure aus Kohlenhydraten durch verschiedene Gärungserreger sind die wichtigsten Beispiele dieser eigentümlichen Reaktion[1]).

Kaum bekannt sind rein chemische Analogien für derartige Reduktionen, die bei den klassischen Beispielen der Alkohol- und Milchsäuregärung von Zuckerarten auf intramolekulare Verschiebungen der H-OH-Gruppen, also auf Wasserabspaltung und Wiederanlagerung, zurückgeführt werden können. Insbesondere sind einfache Vorgänge dieser Art bisher nur bei sehr hohen Temperaturen und im wasserfreien Milieu beobachtet worden; die durchsichtigste dieser Reaktionen liegt im Übergang der Glykole in die entsprechenden Aldehyde oder Ketone vor. Wir denken an die Umwandlung des Äthylenglykols in Acetaldehyd, die sich je nach den Bedingungen beim Erhitzen auf 210° bis 550° oder bei der Destillation mit konzentrierter

[1]) Literatur und Erklärungen siehe bei C. Neuberg, Der Gärungsvorgang und der Zuckerumsatz der Zelle, Monogr. Jena 1913 bei G. Fischer.

Schwefelsäure vollzieht[1]), oder an die analoge Überführung des α-Propylenglykols und des Trimethylenglykols in Propionaldehyd und Aceton[2]), die zum Teil bei 500° bzw. 450° eintritt. Allein keine dieser gewaltsamen Reaktionen hat eine Analogie zu den physiologischen Erscheinungen.

Weit näher stehen diesen mehrere jüngst beschriebene Umwandlungen von Abkömmlingen des Äthylenglykols in Acetaldehyd, die sich unter dem Einfluß des Lichtes[3]) oder bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz[4]) durch sehr merkwürdige Atomverschiebungen vollziehen.

Wir haben nun eine Reaktion aufgefunden, die mit großer Leichtigkeit in wäßriger Lösung und bei Körpertemperatur eine solche Umwandlung von Polyalkoholen und deren Derivaten in Acetaldehyd ermöglicht.

Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf einfach oder doppelt aminiertes Glykol, d. h. bei der Umsetzung von Aminoäthylalkohol (Colamin), $CH_2NH_2-CH_2OH$, und Äthylendiamin, $CH_2NH_2-CH_2NH_2$, mit salpetriger Säure, entstehen bei niedriger Temperatur statt des zu erwartenden Äthylenglykols, CH_2OH-CH_2OH, reichliche Mengen Acetaldehyd, $CH_3.CHO$. Auch die Carbonsäuren des aminierten Äthylenglykols, d. h. Serin

$$\begin{array}{l}CHNH_2-CH_2OH\\ |\\ COOH\end{array}$$

und Isoserin

$$\begin{array}{ll}CH_2NH_2- & CHOH\\ & |\\ & COOH,\end{array}$$

verhalten sich bei der Behandlung mit salpetriger Säure ganz ebenso, indem auch sie mit Leichtigkeit und in bemerkenswertem Umfange in Acetaldehyd übergehen.

[1]) K. Krassuski, Ch. C. 02, II, 1902; A. Faworski, Ch. C. 07, I, 15; J. U. Nef, Ch. C. 04, II, 1201 u. 1282; vgl. auch W. Ipatiew u. W. Leontowitsch, Ber. 36. 2016, 1903; Fourneau u. Tiffenau, Ch. C. 05, II, 237.

[2]) J. U. Nef, l. c.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 59, 1914.

[4]) C. Neuberg u. O. Rubin, diese Zeitschr. 67, 77, 1914.

Für das Äthylenglykol $CH_2OH - CH_2OH$ selbst haben wir schließlich einen einfachen Weg der Umwandlung in Acetaldehyd gefunden. Er besteht in der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz und ist ganz analog der früher beschriebenen Umwandlung von Weinsäure in Glycerinsäure und Acetaldehyd[1]).

Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, daß diese Übergänge mehrerer physiologisch wichtiger Substanzen in Acetaldehyd bei den jetzt erkannten Beziehungen dieser Substanz zu den Gärungsprozessen besondere Beobachtung verdienen.

Man kann den ganzen Vorgang im Prinzip natürlich als eine Isomerisation der Gruppe $\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix}$ zum Aldehydhydrat $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH(OH)_2 \end{matrix}$ auffassen.

Die Eigentümlichkeiten, welche die genannten neuen Reaktionen bieten, sind nun in der Leichtigkeit gelegen, mit der sie eintreten, und in der niederen Temperatur, die zu ihrer Verwirklichung nötig ist.

Es genügt beispielsweise Äthylendiaminchlorid oder salzsauren Aminoäthylalkohol bei Zimmertemperatur mit der äquivalenten Menge Natriumnitrit zusammenzubringen, um alsbaldige Aldehydbildung auszulösen, und bei 40° entführt das entweichende Stickstoffgas deutliche Mengen von Acetaldehyd.

Der leichte Eintritt der Reaktion bietet aber zugleich Schwierigkeiten für die Erklärung. Die für die erwähnte, bei hohen Temperaturen sich vollziehende Umwandlung der Glykole in Aldehyde oder Ketone gemachten Annahmen können hier nicht zutreffen; die Anwendung von verdünnten wäßrigen Lösungen macht die Anhydrisierung zu Äthylenoxyd oder die intermediäre Bildung esterartiger Produkte in hohem Grade unwahrscheinlich. Man wird eher vermuten dürfen, daß sich bei der Desaminierung diazotierte Substanzen[2]) bilden, die zum

---

[1]) C. Neuberg u. O. Rubin, diese Zeitschr. 67, 77, 1914.

[2]) Umlagerungen bei der Diazotierung sind bekannt; so liefert Aminocyclopropan, $\begin{matrix} CH_2 \\ | \\ CH_2 \end{matrix} \!\!> CHNH_2$, Allylalkohol, $CH_2 : CH \cdot CH_2OH$, (N. Kishner, Ch. C. 05, I, 1704), und n-Propylamin, $CH_3.CH_2.CH.NH_2$

Vinylalkohol, $CH_2:CHOH$, in Beziehung stehen und dessen Umlagerung zu Acetaldehyd eine bekannte Erscheinung ist, etwa im Sinne folgender Formulierung:

$$\alpha)\quad \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHNH_2.HCl \end{array} + NaNO_2 = NaCl + H_2O + \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH_2N:NOH \end{array},$$

$$\beta)\quad \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH_2N:NOH \end{array} = N_2 + H_2O + \begin{array}{l} CHOH \\ \| \\ CH_2 \end{array}.$$

Für das Äthylendiamin kann man eine ähnliche Reaktionsfolge aufstellen, aber auch eine vorherige halbseitige Desaminierung zum Aminoäthylalkohol annehmen, die wir tatsächlich haben verwirklichen können.

Noch schwieriger dürfte die Überführung des Äthylenglykols durch Wasserstoffsuperoxyd in Acetaldehyd zu deuten sein. Da sie nur in Gegenwart von Eisen stattfindet, handelt es sich vielleicht um eine Reaktion von Eisenperoxyd mit dem Äthylenglykol und um eine andersartige Abspaltung der nach Art der Oxoniumsalze angelagerten Wasserstoffsuperoxydverbindung, wobei die Isomerisation zu dem Acetaldehydhydrat erfolgt:

$$\alpha)\quad \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + \begin{array}{l} OH \\ | \\ OH \end{array} = \begin{array}{l} CH_2.O\left\langle\begin{array}{l}H\\OH\end{array}\right. \\ | \\ CH_2.O\left\langle\begin{array}{l}H\\OH\end{array}\right. \end{array},$$

$$\beta)\quad \begin{array}{l} CH_2\,O\left\langle\begin{array}{l}H\\OH\end{array}\right. \\ | \\ CH\;H.O\left\langle\begin{array}{l}H\\OH\end{array}\right. \end{array} = \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH(OH)_2 \end{array} + H_2O_2.$$

Auch diese Bildung von Acetaldehyd aus Äthylenglykol kommt bei 40° zustande.

Wie im einzelnen auch die Vorgänge zu deuten sein mögen, sie besitzen unzweifelhaft ein Interesse, da sie die Verwirklichung von Reaktionen auf rein chemischem Wege unter Be-

---

nach L. Henry (Ch. C. 08, I, 222 u. 615) mehr Isopropylalkohol als n-Propylalkohol, ferner der Isoserinaldehyd, $CH_2NH_2-CHOH-CHO$, nach C. Neuberg u. E. Kansky (diese Zeitschr. **20**, 460, 1909), Methylglyoxal, $CH_2:C(OH).CHO$. Die letztgenannte Umwandlung hat mit den hier beschriebenen Vorgängen die größte Ähnlichkeit.

dingungen gestatten, die sich von den natürlichen Umständen nicht allzuweit entfernen. Wir wollen hinzufügen, daß die genannten Umlagerungen keineswegs auf die Glykole der 2-Kohlenstoffreihe beschränkt sind, sondern auch bei den höheren Reihen der mehrwertigen Alkohole durchführbar sind, wie wir demnächst beschreiben werden.

Experimenteller Teil.

A. Überführung von Äthylendiamin in Acetaldehyd.

Versuch 1.

4,0 g salzsaures Äthylendiamin wurden in 20 ccm Wasser gelöst und allmählich durch einen Tropftrichter zu einer Lösung von 4,5 g Natriumnitrit in 50 ccm Wasser gefügt, die in einem Destillationskolben mit seitlichem Ansatz zum Sieden erhitzt war. Der Kolben war durch einen Energiekühler mit einer eisgekühlten Vorlage verbunden. In letzterer sammelte sich eine Flüssigkeit, die deutlich nach Acetaldehyd roch und alle Reaktionen desselben (Riminische Probe, Reduktion von ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung sowie Rötung von fuchsinschwefliger Säure) intensiv gab.

Durch den Tropftrichter wurde wiederholt Wasser in Anteilen von 50 ccm nachgefüllt, solange das Übergehende noch Aldehydreaktionen gab. So wurden 400 ccm aufgefangen, die durch erneute Destillation auf 100 ccm gebracht wurden.

Mit einer Lösung von 3,0 g p-Nitrophenylhydrazin in Essigsäure entstand sofort eine dicke gelbe Fällung, die nach 2 Stunden abgesaugt und zunächst mit verdünnter Essigsäure und dann mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Nach dem Trocknen betrug die Menge des Hydrazons 2,4 g. Dasselbe wurde zur Reinigung in der üblichen Weise aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und schmolz alsdann bei 128°.

0,0966 g Substanz gaben 20,4 ccm N bei 761 mm und 24°.

$C_8H_9N_3O_2$. Berechnet N = 23,46 %; gef. N = 23,67 %.

Der im Destillationskolben verbliebene Rückstand hatte sich gelb gefärbt. Oxalsäure, die nach Hofmann (zit. nach Beilstein, 3. Aufl. 1893, Bd. I, S. 1152) bei der Einwirkung von HNO_2 auf Äthylendiamin auftritt, haben wir in dem Rückstande unter den eingehaltenen Bedingungen nicht gefunden.

Versuch 2.

Zum Zwecke einer quantitativen Bestimmung der entstehenden Aldehydmengen wurden 1,33 g salzsaures Äthylendiamin mit 1,4 g Natriumnitrit in analoger Weise in Reaktion gebracht. Das gesamte Destillat wurde zur Beseitigung eventueller Spuren anhaftender salpetriger Säure noch einmal über etwas Calciumcarbonat destilliert und im Meßkolben auf 500 ccm aufgefüllt. Die titrimetrischen Bestimmungen von je 100 ccm Destillat mit Bisulfitlösung nach der Methode von Ripper-v. Fürth[1]) ergaben 0,0350 g Aldehyd, insgesamt also 0,1750 g Acetaldehyd. Da aus der angewendeten Menge salzsauren Äthylendiamins 0,44 g Acetaldehyd gebildet werden können, so entspricht die isolierte Menge 40 $^0/_0$ der theoretischen Möglichkeit.

Versuch 3.

Auch in der Kälte ist deutliche Bildung von Acetaldehyd bei der Reaktion zwischen Äthylendiamin und salpetriger Säure nachweisbar.

Löst man 3 g salzsaures Äthylendiamin in 50 ccm Wasser und vermischt mit einer Lösung von 2,5 g Natriumnitrit in 50 ccm Wasser, so tritt bei Zimmertemperatur eine starke Gasentwicklung ein. Leitet man den entweichenden Stickstoff in eine gekühlte Vorlage, in der sich 5 ccm Wasser befinden, so gibt letzteres nach einiger Zeit alle Proben auf Acetaldehyd. Man erhält sie schneller und stärker, wenn das Reaktionsgefäß in Wasser von 40° taucht.

B. Überführung von Aminoäthylalkohol in Acetaldehyd.

Versuch 4.

3,5 g Aminoäthylalkohol wurden mit n-Schwefelsäure neutralisiert, wozu 50,5 ccm verbraucht wurden. Die Lösung des Sulfats wurde in der bei Versuch 1 beschriebenen Weise mit der Natriumnitritlösung in Reaktion gebracht[2]). Auch hier ließen wir Wasser nachfließen. Das Destillat, etwa 450 ccm,

[1]) Siehe diese Zeitschr. 26, 207, 1910.

[2]) Daß Aminoäthylalkohol mit salpetriger Säure Stickstoff entwickelt, hat G. Trier (Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 384, 1913) vermerkt, über den Verlauf der Reaktion jedoch nichts angegeben. Dem gleichen Autor verdankt man übrigens die interessante Auffindung des Aminoäthylalkohols unter den Spaltungsprodukten verschiedener natürlicher Phosphatide.

wurde durch anreichernde Destillation auf 150 ccm gebracht und auf das p-Nitrophenylhydrazon verarbeitet. Die Ausbeute an letzterem betrug 1,98 g. Die Substanz schmolz nach der Umkrystallisation bei 128° und war völlig rein.

0,1167 Substanz gaben 24,4 ccm N bei 765,5 mm und 23°

$C_8H_9N_3O_2$. Ber. N = 23,46%; gef. N = 23,82%.

Versuch 5.

Zur quantitativen Bestimmung wurde 0,92 g Aminoäthylalkohol in 15 ccm n-Schwefelsäure zu einer schwachsauren Flüssigkeit gelöst und mit 1,05 g Natriumnitrit umgesetzt. Die weitere Verarbeitung und die Titration des Destillats ergab 0,1906 g Acetaldehyd = 30% der Theorie.

Versuch 6.

Auch bei 40° gelang es, in der zuvor beschriebenen Weise (s. Versuch 3) eine starke Bildung von Acetaldehyd aus Aminoäthylalkohol nachzuweisen.

C. Überführung von Serin und Isoserin in Acetaldehyd.

1,0 g d,l-Isoserin wird in 60 ccm heißem Wasser gelöst und in der angegebenen Art tropfenweise zu einer Lösung von 0,7 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser gefügt. Das Destillat weist auch hier kräftige Acetaldehydreaktionen auf. Die Bildung von Acetaldehyd hört jedoch nach kürzerer Zeit auf und kommt durch einfachen Zusatz von Wasser nicht wieder in Gang. Offenbar ist das Isoserin eine zu schwache Säure, um aus dem Natriumnitrit alle HNO_2 freizumachen. Läßt man nun durch den Tropfentrichter 10 ccm n-Schwefelsäure zufließen, so entwickelt sich abermals kräftig Aldehyd. Um die Diazotierung zu vervollständigen, wurde noch einmal eine Lösung von 0,35 g Natriumnitrit zugesetzt, was neue Überführung in Aldehyd, aber gleichzeitig Entwicklung von Stickoxyden zur Folge hatte. Das Destillat wurde daher über Calciumcarbonat rektifiziert und dann zur Darstellung des p-Nitrophenylhydrazons verwendet. Von letzterem wurde 0,30 g erhalten.

Der Schmelzpunkt lag nach dem Umkrystallisieren bei 127°.

0,0974 g Substanz gaben 20,3 ccm Stickstoff bei 23° und 764,5 mm.

$C_8H_9N_3O_2$. Ber. N = 23,46% N; gef. N = 23,62%.

Versuch 7.

Zur quantitativen Ermittelung des aus d,l-Isoserin erhältlichen Acetaldehyds wurden 1,05 g Isoserin mit 10 ccm n-Schwefelsäure und 40 ccm Wasser in Lösung gebracht und mit 0,8 g Natriumnitrit in der mehrfach beschriebenen Weise behandelt. Das gesamte Destillat wurde noch einmal nach längerem Schütteln mit Calciumcarbonat übergetrieben und auf 200 ccm aufgefüllt. Die Titration ergab einen Gehalt von 0,0795 g Acetaldehyd = 18 % der Theorie.

Versuch 8.

Die Wiederholung des Versuches 7 bei 40° ergab, daß auch unter diesen Bedingungen Acetaldehyd entweicht.

Versuch 9.

0,5 g d,l-Serin wurden in 25 ccm heißem Wasser gelöst und zu 0,35 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser zugetropft. Die Reaktion auf Acetaldehyd im eisgekühlten Destillat ist positiv; ihre Stärke nimmt bei Nachfüllung von 5 ccm n-Salzsäure noch zu.

Versuch 10.

Eine quantitative Bestimmung wurde in der mehrfach beschriebenen Weise ebenfalls mit 0,5 g Serin ausgefüllt. Die Titration ergab, daß 0,0189 g Acetaldehyd = 8,5 % der Theorie gebildet worden waren.

D. Überführung von Äthylenglykol in Acetaldehyd.

Versuch 11.

3,6 g Äthylenglykolhydrat = 2,3 g Äthylenglykol[1]) wurden mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 2,5 %, 1 g krystallisiertem Ferrosulfat und 5 ccm verd. Schwefelsäure versetzt, welch letztere den Ausfall basischer Eisensalze verhindert[2]). Beim Destillieren ging eine Flüssigkeit über, welche sofort mit p-Nitrophenylhydrazinacetat eine dicke gelbe Fällung lieferte und alle Acetaldehydreaktionen in enormer Weise gab. Nach

[1]) Äthylenglykol kommt nach G. Trier (Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 155, 1913) in Pflanzensamen neben Glycerin als Phosphorsäureester vor. Das an der Luft gestandene Präparat ist das Dihydrat $C_2H_6O_2 + 2H_2O$.

[2]) Der Zusatz von verdünnter H_2SO_4 ist unnötig. Im übrigen haben wir uns davon überzeugt, daß beim Destillieren einer wäßrigen Äthylenglykollösung mit verdünnter Schwefelsäure keine Spur Acetaldehyd gebildet wird.

einiger Zeit wird der Ausfall der Aldehydproben im übergehenden Destillat schwach; aber auf Zugabe von 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd setzt die Aldehydbildung wieder ein, und sie wurde auch durch noch dreimaligen Zusatz der gleichen Menge Wasserstoffsuperoxyd nicht beendet. Erst die sechste Destillation blieb erfolglos. Trotz der großen Mengen des verwendeten 2,5%igen Wasserstoffsuperoxyds war das Destillat völlig frei von H_2O_2. Offenbar wird ein großer Teil des Wasserstoffsuperoxyds durch das Eisensalz einfach katalytisch zersetzt und gelangt gar nicht zur Wirkung auf das Glykol. Tatsächlich beobachtet man bei jedem Zusatz eine lebhafte Sauerstoffentwicklung. Wir sind deshalb in den folgenden Versuchen zu einer Verringerung der Wasserstoffsuperoxydmenge geschritten mit dem Erfolge, daß die Reaktion hier ebensogut von statten geht; ja, es hat sich gezeigt, daß der häufigere Zusatz kleiner Wasserstoffsuperoxydmengen bessere Resultate ergibt als weniger Destillation mit mehr H_2O_2. Dieses Verhalten geht aus folgenden Versuchen hervor.

Versuch 12.

Zu 0,93 g Äthylenglykol[1]) wurden nach Zugabe von 1 g Ferrosulfat und 5 ccm Schwefelsäure dreimal je 100 ccm H_2O_2 (1,5%ig) gesetzt. Es wurden jedesmal etwa 50 ccm abdestilliert und das Destillat auf 200 ccm aufgefüllt. Die Titration ergab 0,0583 g Acetaldehyd = rund 9% der Theorie.

Versuch 13.

Die Destillation wurde mit denselben Mengen in der gleichen Weise wie bei Versuch 12 ausgeführt, nur wurde das Wasserstoffsuperoxyd in 6 Portionen von je 50 ccm nachgefüllt. Die Titration ergab 0,1155 g Aldehyd = 17,5% der Theorie.

Versuch 14.

Wiederholung des Versuches 13 aber mit 8 maliger Zugabe von je 40 ccm Wasserstoffsuperoxyd. Gefunden wurden 0,1279 g Aldehyd = 19,4% der Theorie.

Versuch 15.

Das beste Resultat lieferte der gleiche Ansatz von 0,93 g Äthylenglykol mit 1 g Eisensulfat und 5 ccm verdünnter

[1]) Hier und im folgenden stets auf die wasserfreie Verbindung berechnet.

Schwefelsäure bei 12 maliger Destillation mit je 25 ccm derselben Wasserstoffsuperoxydlösung. Gefunden wurden 0,1349 g Aldehyd = 20,4 % der Theorie.

Versuch 16.

Läßt man 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd auf 1,5 g Äthylenglykol in Gegenwart von 0,5 g $FeSO_4$ und 5 ccm verdünnte H_2SO_4 bei 40° einwirken und leitet einen langsamen Luftstrom durch die Mischung und eine dahintergeschaltete, mit einigen Kubikzentimetern eiskaltem Wasser beschickte Waschflasche, so findet man in letzterer nach 1 Stunde Acetaldehyd. Die Bildung des letzteren zieht sich bei 40° lange hin.

Versuch 17.

Trotz des überaus starken Ausfalls der Riminischen Reaktion, die für Acetaldehyd spezifisch[1]) sein soll, haben wir es für nötig gehalten, den Acetaldehyd in den Destillaten aus Äthylenglykol in geeigneter Form zur Analyse zu bringen.

Das Destillat von 4,4 g Äthylenglykol belief sich zunächst auf 450 ccm. Es wurde durch 2 malige Destillation auf 80 ccm gebracht. Die Fällung mit überschüssigem p-Nitrophenylhydrazin, gelöst in 30 %iger Essigsäure, lieferte einen dicken gelben Krystallbrei, der rötliche Partikel einschloß. Letztere rührten von Beimengungen, wahrscheinlich von Glykolaldehydosazon, her[2]). Nach mehrmaliger Umkrystallisation aus 40 %igem Alkohol gelang es jedoch, reines Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon zu erhalten. Dasselbe schmolz bei 124°.

0,0869 g Substanz: 18,4 ccm N (743 mm, 17°).

$C_8H_9N_3O_2$: Ber. N = 23,46 %; gef. N = 23,99 %.

Die prinzipielle Bedeutung der mitgeteilten Versuche liegt darin, daß es sich hier überall um leicht ausführbare intramolekulare Verschiebungen handelt, wie sie bei den Gärungsvorgängen eintreten; insbesondere hat sich eine einfache Überführung der Gruppe $CH_2OH—CHOH—$ in den Rest $CH_3—CH<$ als möglich erwiesen.

[1]) Acrolein und Propionaldehyd kommen nicht in Betracht.

[2]) Vgl. die analogen Erfahrungen von C. Neuberg und O. Rubin (diese Zeitschr. 67, 81, 1914) bei der entsprechenden Verarbeitung der Glycerinsäure.

I. Über die Reduktion des Zimtaldehyds durch Hefe.
II. Vergärung von Benzylbrenztraubensäure.

Von

Elisabeth Róna.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin und der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Dahlem.)

I.

Im Anschluß an die Untersuchung über die zuckerfreien Gärungen der α-Ketosäuren, die durch das Enzym Carboxylase in Kohlendioxyd und den nur ein C-Atom ärmeren Aldehyd gespalten werden, haben Neuberg und Mitarbeiter für eine größere Reihe aliphatischer und aromatischer Aldehyde gezeigt, daß sie durch gärende Hefe zu den entsprechenden Alkoholen hydriert werden. Ein gleiches Verhalten zeigen die fettaromatischen Aldehyde, von denen beispielsweise der Phenylacetaldehyd in Phenyläthylalkohol durch Hefe übergeführt werden kann.

Diese phytochemischen Reduktionen besitzen in mehrfacher Hinsicht Interesse, einmal als exotherme Reaktionen, dann auch, weil die Aldehyde bei zahlreichen Umwandlungen als Zwischenprodukte auftreten und die ihnen entsprechenden Alkohole schließlich in der Natur weit verbreitet sind.

Die bisherigen Erfahrungen sind ausschließlich an gesättigten Verbindungen gewonnen worden, während über ungesättigte Aldehyde keine entsprechenden Untersuchungen vorliegen.

Als einen Vertreter dieser Gruppe habe ich den leicht zugänglichen Zimtaldehyd (β-Phenylacrolein), $C_6H_5.CH:CH.CHO$, gewählt. Aus den experimentellen Befunden geht hervor, daß diese Verbindung von gärender Hefe angegriffen und, wenn

auch nicht besonders leicht, reduziert wird. Als Hauptprodukt entsteht dabei Zimtalkohol, $C_6H_5.CH:CH.CH_2OH$. Für eine Bildung von Zimtsäure habe ich keinerlei Anhaltspunkte gewonnen, so daß ein Verlauf der Umwandlung nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion nicht anzunehmen ist. Neben dem Zimtalkohol tritt vielleicht etwas Hydrozimtalkohol auf, doch ist seine Darstellung in reinem Zustande nicht gelungen. Bemerken möchte ich, daß der isolierte Zimtalkohol in seinen Eigenschaften kleine Abweichungen vom gewöhnlichen Zimtalkohol aufwies, die vielleicht auf das Vorliegen eines Isomeren zu beziehen sind.

Mit Sicherheit geht aus meinen Versuchen hervor, daß auch ein ungesättigter fettaromatischer Aldehyd, der Zimtaldehyd, von Hefe hydriert werden kann.

Experimentelles.

Eine Lösung von 500 g Zucker in 5000 ccm Wasser wurde mit 500 g Hefe M in lebhafte Gärung versetzt. Alsdann wurden aus einem Scheidetrichter sehr langsam im Verlauf von einer Stunde 20 g Zimtaldehyd[1]) hinzugetropft. Dieser war unmittelbar vor Beginn der Versuche frisch im Vakuum destilliert worden. Nachdem ungefähr 3 g Zimtaldehyd eingeflossen waren, war die Gärung sichtbar verzögert und hörte nach Eintragen der gesamten Quantität bei Zimmertemperatur gänzlich auf. Durch Zugabe von 100 g frischer Hefe kam die Gärung bei 38° langsam wieder in Gang. Bis zum Verschwinden des Zuckers war jedoch noch ein allmählicher Zusatz von 400 g Hefe und von 2 l Wasser erforderlich.

Durch Destillation mit Dampf wurden alsdann die flüchtigen Produkte abgetrieben und insgesamt 7 l Destillat aufgefangen. Dasselbe war leicht getrübt infolge eines Gehalts an feinsten Öltröpfchen, die sich leicht mit Äther ausschütteln ließen. Durch Extraktion mit 5 l Äther wurde das Destillat erschöpft. Der Ätherauszug wurde nach flüchtiger Trocknung über Glaubersalz auf 500 ccm gebracht und nunmehr mit einer

---

[1]) Den Zimtaldehyd überließ uns in vortrefflicher Qualität die chemische Fabrik von Schimmel & Co. in Leipzig, der wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichen Dank zum Ausdruck bringen möchten.

Lösung von 150 ccm 15 % iger Natriumbisulfitlösung ausgeschüttelt[1]). Letztere entzog eine nicht unbeträchtliche Menge unveränderten Zimtaldehyds und entfärbte zugleich den braungelben Ätherextrakt bis zum hellgelben Ton.

Zur weiteren Verarbeitung wurde dieser Ätherauszug mit dem ebenso gewonnenen Extrakt aus einem zweiten ganz gleichartig angestellten Gäransatz vereinigt.

Die mit wenig Wasser durchgewaschenen Ätherauszüge wurden jetzt gründlich über entwässertem Natriumsulfat getrocknet und dann auf dem siedenden Wasserbade am Birektifikator vom Äther befreit. Die fraktionierte Destillation des Rückstandes lieferte zwei Hauptanteile, und zwar fast 4 g Substanz vom Siedepunkt 230 bis 240°, sowie eine mehr als doppelt so große Fraktion, 8,5 g, die von 246 bis 254° sott. Durch erneute Destillation gelang es, aus letzterer 5 g eines kaum gelb gefärbten dickflüssigen Liquidums zu gewinnen, das von 248 bis 252° überging und bei der Analyse auf Zimtalkohol (β-Phenylallylalkohol) gut stimmende Werte ergab.

0,1527 g Substanz : 0,4499 CO_2 und 0,1072 H_2O.

$C_9H_{10}O$. Ber. C = 80,59, H = 7,46 %;
(134) gef. C = 80,35, H = 7,80 %.

In der Literatur wird für Zimtalkohol ein Siedepunkt von 250° und gleichzeitig ein Schmelzpunkt von 33° angegeben. Während die aus Zimtaldehyd durch Reduktion mit Hefe gewonnene Substanz nach ihren Eigenschaften beim Sieden durchaus dem gewöhnlichen Zimtalkohol aus Storax entspricht, war sie bei gewöhnlicher Temperatur nicht zum Krystallisieren zu bringen. Im Frigo bei — 9° erstarrte sie zu einer von Öl durchsetzten talgartigen Masse, die sich jedoch bei Zimmertemperatur wieder vollständig verflüssigte. Die Angaben von Erlenmeyer[2]) über die Existenz optisch-aktiver Zimtsäurederivate veranlaßte mich, das polarimetrische Verhalten meiner Substanz zu untersuchen. Sie war deutlich rechtsdrehend[3]), und zwar in

---

[1]) Ist die Bisulfitlösung zu stark, so scheidet sich das Zimtaldehydadditionsprodukt in fester Form aus.

[2]) E. Erlenmeyer und G. Hilgendorff, diese Zeitschr. **35**, 134, 1911; **43**, 445, 1912.

[3]) Das Ausgangsmaterial, der Zimtaldehyd, war optisch völlig inaktiv.

1 dcm langer Schicht = + 0,25°. Ob diese Drehung auf einen aktiven Zimtalkohol zu beziehen ist, möchte ich nicht entscheiden, sondern nur das Faktum der vorhandenen Rechtsdrehung anführen.

Die niedrig siedende, zwischen 230° bis 240° übergehende Fraktion wurde nochmals aus einem kleinen Siedekölbchen vorsichtig destilliert. Es gelang jedoch nicht, einen schärfer siedenden Anteil herauszufraktionieren. Die Analyse ergab keine befriedigend auf Hydrozimtalkohol stimmenden Werte, so daß die Bildung des auch in der Seitenkette reduzierten Alkohols unsicher bleiben muß. Wiederholungen der Versuche mit derselben obergärigen Hefe M wie mit der untergärigen Hefe K ergaben keine Klärung dieses Punktes, da mit Hefe M auch bei entsprechender Verarbeitung von 40 g Zimtaldehyd die Ausbeute an niedrig siedender Fraktion nur 2 g, bei Hefe K nur 0,7 g betrug.

Es sei noch bemerkt, daß sich beide Fraktionen in allen Fällen durch den negativen Ausfall der Probe mit fuchsinschwefliger Säure als frei von unverändertem Zimtaldehyd erwiesen; er war durch die vorangegangene Behandlung mit Bisulfit völlig entfernt worden.

II.

Nachdem sich verschiedene Homologe der Brenztraubensäure gleich dem Anfangsgliede der α-Ketosäurenreihe der zuckerfreien Gärung durch Hefen fähig erwiesen haben, schien es im Zusammenhange mit der zuvor beschriebenen phytochemischen Reduktion des Zimtaldehyds angebracht, das Verhalten der diesem nahestehenden Benzylbrenztraubensäure, $C_6H_5CH_2.CH_2.CO.COOH$, zu untersuchen. Hinzu kam, daß die genannte Ketosäure noch das besondere Interesse besitzt, daß an ihr Knoop[1]) zum ersten Male die physiologische Umwandlung einer α-Ketosäure in die entsprechende Aminosäure beim Tier festgestellt hat.

Die Prüfung mit obergärigen und untergärigen Hefen des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin hat ergeben, daß die

---

[1]) F. Knoop, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 489, 1910; 71, 252, 1911.

Benzylbrenztraubensäure, wenn auch sehr langsam und unvollständig, vergoren wird. Die Loslösung von Kohlensäure erstreckt sich auf mehrere Tage und ist am kräftigsten mit der Oberhefe XII und der Unterhefe K.

Es gelang mir, eine kleine Menge Phenylpropylaldehyd (Hydrozimtaldehyd), $C_6H_5.CH_2.CH_2.CHO$, zu isolieren und als p-Nitrophenylhydrazon abzuscheiden. Daraus geht hervor, daß die Benzylbrenztraubensäure durch Hefe prinzipiell in gleichem Sinne wie Brenztraubensäure selbst zerlegt wird.

Experimentelles.

a) 17,8 g Benzylbrenztraubensäure wurden, mit 50 ccm 2 n-KOH versetzt, mit 1700 ccm Wasser von 35° und mit $^n/_{10}$-HCl bis zur sauren Reaktion auf Lackmus angesäuert. Zu der so in Lösung, bezw. in feinste Verteilung gebrachten Benzylbrenztraubensäure wurden alsdann 170 g Hefe XII gefügt und das Gemisch 6 Tage im Brutschrank belassen.

Das Gärgut wurde alsdann aus einem großen Kupfertopf im Wasserdampfstrom unter gleichzeitiger Durchleitung von Kohlensäure destilliert, wobei 1700 ccm aufgefangen wurden. Das Destillat wurde mehrfach gründlich mit Äther ausgeschüttelt und die gesammelten Ätherauszüge nach dem Waschen mit Sodalösung in üblicher Weise über Glaubersalz getrocknet. Beim Verdampfen des Ätherextraktes hinterblieb ein dunkles Öl, das direkt mit einer alkoholischen Lösung von p-Nitrophenylhydrazin versetzt wurde. Beim Stehen im Eisschrank schied sich schnell ein brauner Krystallkuchen ab, der abgesaugt und nach dem Trocknen dreimal aus benzolhaltigem Ligroin umkrystallisiert wurde. Es resultierte rund 1 g hellgelber Krystalle vom Schmelzpunkt 122 bis 123°. Die Analyse ergab Werte, die auf das p-Nitrophenylhydrazon des Phenylpropylaldehyds stimmen.

0,1057 g Substanz, 14,3 ccm N (19°, 759 mm).

$C_{15}H_{15}N_3O_2$ (Mol 269): Ber. N = 15,61 %; gef. N = 15,51 %.

Das bisher allem Anscheine nach nicht beschriebene p-Nitrophenylhydrazon des Phenylpropylaldehyds bildet bei langsamer Abscheidung prächtige Nadelbüschel; es kann auch aus wasserhaltigem Alkohol umkristallisiert werden, woraus es sich in schwefelgelben Nädelchen leicht und sehr vollständig abscheidet. Das p-Nitrophenylhydrazon ist ein charakteristi-

sches Derivat des Hydrozimtaldehyds, das zur Abscheidung kleiner Mengen recht geeignet ist.

b) Ein genau entsprechender Versuch wurde mit 22,2 g Benzylbrenztraubensäure und 200 g Hefe in 2,2 l Wasser angestellt. Die Aufarbeitung geschah in der gleichen Weise. Die Ausbeute war auch hier zu gering, um eine Darstellung des Phenylpropionaldehyds in Substanz zu ermöglichen. Seine Lösung roch zugleich nach Zimtaldehyd und Flieder. Sie färbte sich mit Fuchsinschwefligersäure lila und mit conc. Schwefelsäure himbeerfarben. Wiederum gelang die Isolierung des p-Nitrophenylhydrazons. Davon wurden 0,6 g vom Schmelzpunkt 120° erhalten.

Die Benzylbrenztraubensäure (II) ist ein Substitutionsprodukt der α-Ketobuttersäure (I) und in gewissem Sinne mit ihr zu vergleichen:

$$CH_3 . CH_2 . CO . COOH \quad (I)$$

$$C_6H_5CH_2 . CH_2 . CO . COOH \quad (II).$$

Nach den Erfahrungen von Neuberg und Kerb[1]) liefert die zuckerfreie Vergärung der letzteren zwar Propylaldehyd, allein die Ausbeute daran bleibt ebenfalls bescheiden.

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 413, 1912.

Über die Wirkung der Salzsäure auf die Alkaliausscheidung.

Von

Rizzardo Secchi.

Aus dem Institut für medizinische Pathologie der Universität Bologna.)

(Eingegangen am 15. Juni 1914.)

In den letzten 30 Jahren ist in einer größeren Reihe von Untersuchungen darauf hingewiesen worden, daß die Zunahme der im Körper entstehenden oder eingeführten Säuren eine Vermehrung der Alkaliausscheidung durch Harn und Faeces hervorbringt. Die Steigerung des Säuregehalts im Organismus kann entweder auf übermäßiger Gärung einiger Nahrungsbestandteile im Magen, oder auf besonderen Veränderungen des intermediären Stoffwechsels wie auch auf einer vermehrten Einführung von Säuren beruhen. Die einzelnen Alkalien verhalten sich gegen Säuren bei fleischfressenden Tieren anders als bei pflanzenfressenden.

Walter machte im Jahre 1887 die ersten Untersuchungen in dieser Richtung und fand, daß Salzsäure und Phosphorsäure bei Hunden eine bedeutende NH_3-Ausscheidung, bei Kaninchen dagegen einen starken Na- und K-Verlust durch den Harn bewirken; weiter fand er, daß Hunde eine große Menge von Säuren ohne Beschwerden vertragen, während Kaninchen schon bei kleinen Mengen derselben zugrunde gehen.

Aus seinen Resultaten zog Walter den Schluß, daß bei Kaninchen, deren Blut fast kein Ammoniak enthält, die Säuren sich mit Na und K verbinden: es sind also die Säureprodukte des Stoffwechsels, die in den Geweben in ungebundenem Zustande bleiben, die schädlich auf die Tiere einwirken. Dagegen werden bei Hunden, bei denen viel Ammoniak im Blute vorhanden ist, die resorbierten Säuren neutralisiert, so daß Na und K nicht angegriffen werden.

Nach Erscheinen der Arbeit von Walter konnten viele andere Autoren, wie Munck, Feder, Voit, Hallevorden, Coranda, Gregor, Camerer u. a., diese Angaben bestätigen.

Auf Grund dieser Forschungen wurde festgestellt, daß das NH_3 das fixe Alkali des Blutes vor Säureintoxikation schützt. Neuere Unter-

suchungen aber konnten den Beweis erbringen, daß nicht immer das NH_3 allein das neutralisierende Agens Säuren gegenüber ist, sondern daß auch oft die fixen Alkali, besonders Na, K und Ca, gleichzeitig eine solche Rolle spielen.

Walter konnte schon in seinen Versuchen beobachten, daß die Menge des ausgeschiedenen Ammoniaks im Harn kleiner war als jene, die den eingeführten Säuren entsprach. Hieraus folgerte er, daß diese Säuren, die nicht an NH_3 gebunden waren, eine Ausscheidung der fixen Alkalien des Blutes verursacht hätten. Dieselbe Beobachtung machte Coranda an Menschen. Er behauptet, daß dies entweder auf eine nicht vollständige Resorption der Säuren im Darme oder auf eine nach der eigentlichen Versuchsperiode andauernde NH_3-Ausscheidung zurückzuführen sei. Gaethens hat auf Grund seiner Untersuchungen nachgewiesen, daß nur unter besonderen Bedingungen die resorbierten Säuren durch Ammoniak selbst neutralisiert werden. Wenn es nämlich im Blute nicht in großen Mengen vorhanden ist, so werden auch die fixen Alkalien ausgeschieden, wie es bei Herbivoren der Fall ist. Bereits Rudel hatte darauf aufmerksam gemacht, daß Salzsäurezufuhr bei Hunden und Menschen die Kalkausscheidung durch den Harn steigert. Limbeck fand bei einem Mädchen nach Verabreichung von Milchsäure eine stärkere Zunahme von Na und K im Harn als von Ammoniak und in den Faeces eine deutliche Steigerung des Na-, K-, Ca- und Mg-Gehaltes. Die Anreicherung der fixen Alkalien im Harn geht rasch vor sich und verschwindet schnell, sobald die Säureperiode vorüber ist, während die Ammoniakausscheidung sich bis in die Nachperiode erstreckt. Bei Salzsäurezufuhr (4,02 g HCl) fand Limbeck im Harn desselben Mädchens eine starke und rasche Vermehrung von Na und K, während das Ca nach einer anfänglichen vorübergehenden Verminderung, später bis auf die doppelte Menge anwuchs: das NH_3 trat langsam in Reaktion.

Granström fand bei Kaninchen nach Zufuhr von Salzsäure Kalkvermehrung im Harn und eine gleichzeitige Abnahme desselben in den Faeces: bei Phosphorsäurezufuhr aber einen Kalkverlust in beiden Ausscheidungen. Die Untersuchungen von Luithlen zeigten ferner, daß durch eine bestimmte Menge aufgenommener Salzsäure bei Kaninchen nicht eine genau entsprechende Menge von Alkali dem Körper, sondern ein Überschuß derselben entzogen wird.

Ich habe meinerseits einige experimentelle Untersuchungen an Hunden, Kaninchen und Menschen gemacht, um das Verhalten der einzelnen Alkalien bei Zufuhr von Salzsäure kritisch zu beleuchten.

Für die Kalkbestimmung habe ich eine von Novi[1]) modifizierte Methode angewendet: Natrium und Kalium wurden

[1]) Ivo Novi, Azione disintegrante del NaCl sul cervello. Accad. delle Scienze mediche di Bologna, 8, Maggio 1910.

nach dem Verfahren, das Daddi in seinem Lehrbuch beschrieben hat, bestimmt; die Ammoniakbestimmung endlich erfolgte nach der Schlössing-Neubauerschen Methode.

Versuch 1.

Männlicher Hund von 14 kg Gewicht bekam täglich 400 g Pferdefleisch, 150 g Weißbrot, 2 g Knochenmehl und 600 g destilliertes Wasser; diese Kost enthielt im ganzen 1,04 g CaO und 0,40 g MgO. Während der zweiten Periode wurden der Kost 4,56 g HCl zugemischt. Die Resultate sind folgende: K + Na˙ steigen schon am 1. Tag der Säureperiode von 2,45 g im Mittel auf 3,60 g an, um in der Nachperiode bald wieder auf die normalen Werte herabzugehen. Das NH_3 dagegen zeigt eine langsamere Zunahme von 0,70 g im Mittel auf 0,97 g bis 1,10 g in 2 Tagen der Säureperiode: diese Zunahme erreicht in der Nachperiode noch eine Höhe von 1,12 bis 1,21 g. Dieses Verhalten stimmt also mit dem von Limbeck beobachteten überein. Über die Bilanz von Ca und Mg gibt die folgende Tabelle eine genaue Übersicht:

Periode	Tage	Einnahme		Ausgabe				Bilanz	
				Harn		Kot			
		CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1.	7	7,28	2,80	0,60	0,66	6,16	1,68	+ 0,52	+ 0,46
2.	2	2,08	0,80	0,32	0,28	1,46	0,44	+ 0,30	+ 0,08
3.	2	2,08	0,80	0,20	0,20	2,20	0,52	− 0,32	+ 0,08

Während der Säureperiode nimmt das Ca im Harn von 0,08 g auf 0,14 bis 0,17 g zu und sinkt in der Nachperiode auf 0,13 bis 0,06 g, das Mg von 0,09 g im Mittel pro Tag auf 0,126 bis 0,16 g, fällt dagegen in der Nachperiode wieder auf 0,11 bis 0,09 g herunter. Mit den Faeces wurden während der ersten Periode 0,88 g CaO und 0,24 g MgO, während der zweiten 0,73 g CaO und 0,22 g MgO, während der dritten 1,10 g CaO und 0,26 g MgO täglich ausgeschieden. In der Säureperiode finden wir also eine Zunahme des Ca und Mg im Harn und eine gleichzeitige Abnahme derselben in den Faeces: dies stimmt mit den Versuchen von Granström völlig überein. In der Nachperiode weist das Ca eine bedeutende

Steigerung auf, während das Mg kaum den normalen Wert übertrifft. Was die Bilanz betrifft, finden wir in der Säureperiode einen Ca-Ansatz, in der Nachperiode einen starken Ca-Verlust: die Mg-Bilanz zeigt gleiche Schwankungen, aber in geringerem Grade.

Versuch 2.

Männlicher Hund, Gewicht 24 kg, erhält täglich 800 g Pferdefleisch und Wasser. Am 1. Tage der zweiten Periode wurden dem Futter 1,85 g, am 2. Tage 3,61 g, am 3. Tage 5,42 g HCl zugefügt. Die Versuche ergaben folgendes: In der Vorperiode wurden durch den Harn im Mittel pro Tag 1,61 g NH_3, 3,35 g K + Na, 0,064 g CaO und 0,123 g MgO ausgeschieden. In den 3 Tagen der Säureperiode stiegen NH_3 auf 1,76—3,56—4,59 g, K + Na auf 3,98—5,41—4,96 g an. In der Nachperiode sinken letztere, während das NH_3 sich über dem täglichen Mittelwert der Vorperiode hielt (3,21—2,16—2,09 g), unter den Mittelwert der Vorperiode herab.

In diesem Versuche wächst also die im Harn ausgeschiedene Menge von Kalium und Natrium, sobald die Salzsäurezulage erfolgt, rasch an und erreicht schnell, unmittelbar nach Aufhören derselben, Werte, die sogar unter der Norm liegen. Die auffallende NH_3-Zunahme dagegen hält während der ganzen Nachperiode an.

In der folgenden Tabelle ist die Ca- und Mg-Bilanz zahlenmäßig zusammengestellt.

Periode	Tage	Einnahme		Ausgabe				Bilanz	
				Harn		Kot			
		CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1.	3	0,46	1,25	0,19	0,37	0,81	0,54	— 0,54	+ 0,34
2.	3	0,51	1,28	0,22	0,40	0,93	0,50	— 0,64	+ 0,38
3.	3	0,44	1,25	0,26	0,39	2,13	0,90	— 1,95	— 0,04

Während der Säureperiode zeigten das Ca, wie auch das Mg, fast keine Zunahme: in der Nachperiode ist nur ein sehr geringes Ansteigen des Kalkgehalts erkennbar.

Die Ausscheidung im Kot, die normal in der Vorperiode 0,27 g CaO und 0,18 g MgO im Mittel pro Tag beträgt, steigt in der Säureperiode bis auf 0,31 g CaO und 0,16 g MgO und

in der Nachperiode bis auf 0,71 g CaO und 0,30 g MgO an. Gleichzeitig mit der Säurezufuhr ist demnach kein bedeutender Ca- und Mg-Verlust zu beobachten, in der Nachperiode dagegen ein solcher deutlich vorhanden. Wie kommt dieser späte Mineralverlust zustande? Es liegt nahe anzunehmen, daß der Körper einen Reservevorrat an NH_3, K und Na im Blute speichert und die resorbierte Salzsäure mit dieser sich zuerst verbindet. Späterhin ist die Alkalireserve aufgebraucht, also müssen nun das Ca und Mg der Knochengewebe zur Ausnutzung gelangen.

Vielleicht aber zerstören die Säuren, die im Blute resorbiert sind, eine gewisse Menge von Eiweißkörpern, damit werden andere Säuresubstanzen frei gemacht, wobei andere Alkalien ausgeschieden werden.

Versuch 3.

Kaninchen, Gewicht 2,660 kg: tägliches Futter besteht aus 600 g Blumenkohlblätter. In der Säureperiode wurden ca. 50 — 100 — 200 — 300 ccm von einer $^n/_{10}$-Salzsäurelösung mittels Magensonde eingeführt. Auf das Befinden des Tieres hatte diese Verabreichung keinerlei Einwirkung. Die Verhältnisse in der Harnausscheidung waren folgende: Während der Vorperiode wurden täglich im Mittel ausgeschieden: NH_3 0,066 g, K + Na 1,92 g, CaO 067 g, MgO 0,24; in den 4 Tagen der Säureperiode bzw. NH_3 0,065 — 0,074 — 0,092 — 0,089 g, K + Na 2,49 — 2,28 — 1,98 g, CaO 0,79 — 0,89 — 0,93 — 1,18 g, MgO 0,25 — 0,31 — 0,48 — 0,51 g. Während der Nachperiode (die Zahlen vom 2. Tage fehlen) bzw. NH_3 0,086 — 0,078 g, K + Na 1,90 — 2,24 g, CaO 1,13 — 0,86 g, MgO 0,47 — 0,26 g.

In diesem Versuche ist die durch den Harn ausgeschiedene Kalkmenge auffallend groß. Diese reiche Kalkausscheidung beweist eine starke Durchlässigkeit der Kaninchennieren für Kalk. Auf diesen Zustand wurde schon von Lafayette, Mendel, Stanley und Benedikt hingewiesen. Diese Autoren fanden in der Tat, daß das intravenös injizierte Chlorcalcium bei Kaninchen im Verhältnis von 50 bis 60%, bei Hunden im Verhältnis von 15 bis 20% durch den Harn ausgeschieden wird.

Was die neutralisierende Wirkung gegen Säure betrifft,

so wird sie in diesem Versuche überall durch Kalk und Magnesium, zweitens durch Natrium und Kalium, schließlich in sehr geringem Grade durch Ammoniak herbeigeführt.

Die Resultate der Faecesanalysen sind folgende: Während in der Vorperiode 0,51 g CaO und 0,08 g MgO täglich ermittelt wurden, so finden wir in der Säureperiode 0,91 g CaO und 0,13 g MgO. Diese Werte fallen in der Nachperiode wieder bis auf 0,82 g CaO und 0,11 g MgO. Die Kalkbilanz in der Vorperiode war stark positiv, in der Säureperiode wie in der Nachperiode nur schwach positiv.

Die Salzsäurezufuhr hat also bei diesem Kaninchen eine starke Ca- und Mg-Ausscheidung bewirkt, und zwar mehr auf dem Wege durch den Harn als durch die Faeces. Außerdem war eine kaum deutliche K- und Na-Ausscheidung zu konstatieren, während die NH_3-Abgabe unbeeinflußt blieb.

Versuch 4.

Kaninchen, im Gewicht von 2,300 kg, wird mit 200 g Maismehl, 50 g Weißbrot und 200 g destilliertes Wasser täglich gefüttert. Während der zweiten Periode bekam es täglich anstatt 200 g nur 100 g Wasser, aber dafür 100 g einer $^n/_{10}$-Salzsäurelösung. Mit dieser Kost erhielt das Tier in jeder Periode 0,28 g CaO und 0,24 g MgO.

Harnausscheidung:

Vorperiode (durchschnittlich pro Tag):

NH_3 0,07 g, K + Na 1,32 g, CaO 0,18 g, MgO 0,13 g.

Säureperiode:

NH_3 0,075 g, K + Na 1,75 g, CaO 0,31 g, MgO 0,23 g.

Nachperiode:

NH_3 0,065 g, K + Na 1,40 g, CaO 0,25 g, MgO 0,21 g.

Kotabgabe:

Vorperiode (in ganzen):

CaO 0,19 g, MgO 0,14 g.

Säureperiode:

CaO 0,34 g, MgO 0,19 g.

Nachperiode:

CaO 0,21 g, MgO 1,16 g.

Auch in diesem Falle entzieht sich das NH_3 fast gänzlich dem Salzsäureeinfluß. K + Na vermehren sich vorübergehend im Harn, Ca und Mg zeigen dagegen eine deutliche und dauernde Zunahme im Harn wie auch im Kot. Die Ca-Bilanz, die gleich zu Beginn schwach negativ war, weist späterhin starke Verluste auf.

Versuch 5.

Versuchsobjekt: Mann (R. Raphael), 62 Jahre alt, Körpergewicht 56 kg; leidet seit 3 Monaten an Magenbeschwerden: deutliche Abmagerung. Probemahlzeit nach Leube-Riegel wird nach $2^1/_2$ Stunden mittels Sonde ausgehebert: Gesamtacidität $0{,}14\,^0/_{00}$, keine freie Salzsäure, Milchsäurereaktion fällt kaum positiv aus. Diagnose: Magenkrebs. Patient genoß täglich: 2000 g Milch, 2 Eier, 600 g, 500 ccm Wasser: am 4., 5., 6. Tage außerdem bzw. 3, 6, 8 g konzentrierter Salzsäure = 1,35, 2,31, 3,61 HCl. Diese Kost enthielt 3,81 g CaO und 0,75 g MgO.

Harnausscheidung:

Vorperiode (Durchschnitt pro Tag):
NH_3 0,60 g, K + Na 4,66 g, CaO 0,35 g, MgO 0,126 g.

Säureperiode (im einzelnen Tag):
NH_3 0,96 — 1,19 — 1,26 g, K + Na 5,25 — 6,19 — 5,60 g,
CaO 0,47 — 0,39 — 0,42 g, MgO 0,11 — 0,12 — 0,13.

Nachperiode (Durchschnitt pro Tag):
NH_3 0,92 g, K + Na 4,47 g, CaO 0,40 g, MgO 0,09 g.

In der folgenden Tabelle ist die Ca- und Mg-Bilanz zusammengestellt:

Periode	Tage	Einnahme		Ausgabe: Harn		Ausgabe: Kot		Bilanz	
		CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1.	3	11,43	2,24	1,12	0,37	5,86	1,82	+ 4,45	+ 0,05
2.	3	11,43	2,24	1,19	0,37	7,16	1,96	+ 3,08	− 0,09
3.	3	11,43	2,24	1,20	0,27	6,81	2,15	+ 3,42	− 0,18

Wenn wir die Ergebnisse der an dieser Versuchsperson angestellten Versuche betrachten, so erhellt, daß während der Säureperiode überall das NH_3 und K + Na im Harn zunehmen,

mit dem Unterschiede, daß die vermehrte NH_3-Ausscheidung auch in der ganzen Nachperiode fortdauert, die K + Na-Zunahme dagegen schon am ersten Tag der Nachperiode verschwindet. Auch der Ca-Gehalt zeigt eine gelinde Steigerung im Harn, während das Mg unverändert bleibt.

In den Faeces können wir während der Vorperiode eine tägliche Kalkmenge von 1,95 g (= 51%) des eingeführten Kalkes), während der Säureperiode 2,39 g (= 63%) und in der Nachperiode 2,27 g (= 60%) konstatieren. Auch das Mg in den Faeces der Säureperiode, und noch mehr in jenen der Nachperiode, wächst deutlich: folglich wird hier die Bilanz stark negativ.

Man kann also sagen, daß die Wirkung der Salzsäure auf die Gesamtalkaliausscheidung beim Menschen ähnlich wie beim Hunde verläuft, da im Harn stets NH_3 und K + Na, im Kot Ca und Mg ausgeschieden werden.

Versuch 6.

Weiter habe ich untersucht, welchen Einfluß Zufuhr von Schweinemagensaft in Form des französischen Präparates „Dyspeptin" auf die Alkaliausscheidung ausübt.

Ein Mann verzehrte täglich 2000 g Milch, 1000 g Suppe, 4 Eier; außerdem in der zweiten Periode täglich 80—120—120 g Dyspeptin.

Die Ergebnisse sind folgende:

Harnausscheidung:

Vorperiode (Durchschnitt pro Tag):

NH_3 0,66 g, K + Na 4,60 g, CaO 0,34 g, MgO 0,16 g.

Säureperiode (jeden Tag):

NH_3 0,66 — 0,85 — 0,83 g, K + Na 4,47 — 4,90 — 4,73 g,
CaO 0,34 — 0,35 — 0,33 g, MgO 0,15 — 0,17 — 0,16 g.

Nachperiode (Durchschnitt pro Tag);

NH_3 0,67 g, K + Na 4,68 g, CaO 0,32 g, MgO 0,16 g.

Kotabgabe:

Vorperiode (Durchschnitt pro Tag):

CaO 1,61 g, MgO 0,34 g.

Säureperiode:

CaO 1,72 g, MgO 0,30 g.

Nachperiode:

CaO 1,81 g, MgO 0,39 g.

Aus diesen Daten ist zu ersehen, daß eine geringe Zunahme im Gehalt an NH_3 und K + Na eingetreten ist; die letzteren können jedoch von dem im Dyspeptin enthaltenen Na stammen. Das Calcium in den Faeces ist unbedeutend vermehrt. Ob dies aber auf Konto der Säurewirkung oder auf ungenaue Kotabgrenzung zu setzen ist, ist die Frage, da bei dieser kalkreichen Diät einige nicht zur richtigen Periode zugerechnete Gramme Kot ungeheure Fehler verursachen können. Wenn ich nun meine Untersuchungen zusammenfassend betrachte, so kann ich daraus folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei dem mit animalischer oder vorzugsweise animalischer Nahrung gefütterten Hunde erzeugt die Salzsäurezufuhr eine auffallende Zunahme des NH_3 und K + Na im Harn, nur mit dem Unterschied, daß K + Na rasch und vorübergehend reagieren; die NH_3-Ausscheidung dagegen dauert nach Aufhören der Säureperiode fort.

Die Ca- und Mg-Ausscheidung im Harn wird nicht erheblich beeinflußt. Jedoch ist die Abgabe durch den Kot deutlich vermehrt, besonders trifft dies für Ca zu. Wenn das Tier eine ungenügende Menge von Kalksalzen mit der Nahrung einnimmt, kann ein Kalkverlust der Gewebe eintreten.

2. Bei dem mit frischem und kalkreichem Kohl gefütterten Kaninchen bewirkt die Salzsäurezufuhr eine starke Steigerung des Ca- und Mg-Gehaltes und eine schwächere von K + Na im Harn; die NH_3-Menge bleibt dagegen so gut wie unverändert. Auch in den Faeces ist das Ca vermehrt, aber weniger als im Harn. Bei dem mit kalkarmer Nahrung gefütterten Kaninchen trat nach Verabreichung von Salzsäure ein starker Ca-Verlust der Gewebe ein.

3. Bei Menschen sind die Effekte der Salzsäurezufuhr ähnlich wie bei Hunden, da im Harn die NH_3- und K + Na-Menge anwächst, nicht aber, oder fast nicht, der Gehalt an Ca und Mg. Diese letzteren kommen dagegen vermehrt in den Faeces zur Ausscheidung. Bei Einführung kleiner Quantitäten Salzsäure (Dyspeptin) reagiert nur NH_3 und vielleicht auch K + Na.

Die alte Ansicht, daß bei Säureintoxikation das NH_3 als einzige und hauptsächliche neutralisierende Substanz wirkt, ist auf Grund der Ergebnisse meiner Arbeit nicht richtig. Veranlassung zu dieser irrtümlichen Auffassung war der Umstand, daß man die Kalkausscheidung durch den Darm nicht genau kannte. Man kann dagegen annehmen, daß die Salzsäurezufuhr den Gehalt des NH_3 und $K + Na$ im Harn in verschiedenen Verhältnissen zueinander, je nach der Art der Diät, erhöht. In den Faeces bewirkt sie eine mehr oder weniger große Steigerung des Ca und Mg, die von der Menge der eingeführten Säuren abhängig ist. Es scheint unmöglich, eine graduelle Reaktionsempfindlichkeit der verschiedenen Alkalien gegen Säuren aufzufeststellen. Wir sind jedoch zu der Vermutung berechtigt, daß, wenigstens bei fleischfressenden Tieren und Menschen, NH_3 und Na in dieser Beziehung wegen ihrer Verbreitung im Organismus an erster Stelle stehen; weiterhin folgen K, Ca und endlich Mg.

Über den Ca- und Mg-Stoffwechsel bei Hyperchlorhydrie.

Von

Rizzardo Secchi.

(Aus dem Institut für medizinische Pathologie der Universität Bologna.)

(Eingegangen am 15. Juni 1914.)

In der voraufgehenden Arbeit konnte ich zeigen, daß Salzsäurezufuhr bei Menschen nicht nur eine Zunahme der NH_3- und der K + Na-Menge im Harn bewirkt, sondern auch eine deutliche Abgabe des Ca und Mg durch den Kot. Diese Erscheinungen waren auch früher nicht unbekannt, da schon andere Autoren, wie Rudel und v. Limbeck, durch Säuredarreichung einen solchen Ca-Verlust gefunden hatten. Über einen exakten Ca-Umsatz unter diesen Bedingungen liegen jedoch nur wenige Angaben in der Literatur vor.

Es erschien uns nun sehr interessant zu erfahren, ob auch die im Körper unter pathologischen Verhältnissen entstehende Säurezunahme einen ähnlichen Einfluß auf den Ca- und Mg-Stoffwechsel ausübt wie die experimentelle Säureentgiftung. v. Limbeck hat zahlreiche Untersuchungen an Kranken, bei denen eine endogene Säureintoxikation höchstwahrscheinlich vorhanden war, angestellt und oft eine auffallend vermehrte Kalkausscheidung gefunden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Neubauer, v. Noorden, Gerhard und Schlesinger bei Diabetes mit Acidose. Reale beobachtete im Harn von Gichtkranken mit Säureintoxikation neben phosphorsaurem Kalk auch schwefelsauren Kalk, was darauf hinzuweisen schien, daß ein Teil der pathologisch gesteigerten Schwefelsäure mit dem Kalke gebunden ausgeschieden wurde.

Die Zunahme der Säuren im Körper, die durch übermäßige Gärung im Magen entstehen, zeigt ähnliche Wirkung auf den Kalkstoffwechsel. Robin und Ferrier glauben, daß die Ver-

dauungsstörungen als eine gewöhnliche und deutliche Ursache der Kalkverarmung des Organismus anzusehen sind. Ferrier machte die Beobachtung, daß bei Menschen, die in kalkreichen Ländern wohnen, oft krankhafte Erscheinungen zu konstatieren sind, die wohl sicher auf eine Kalkarmut der Gewebe zurückgeführt werden können, wie z. B. die Zahnkaries. Bei diesen Menschen konnte Ferrier schlechte Ernährungsgewohnheiten feststellen, so übermäßige Zufuhr von Fetten oder von stärkeartiger Nahrung. Die subjektiven Leiden sind meistens sehr leichter Natur oder fehlen gänzlich, eine sorgfältige Untersuchung kann aber fast immer pathologische Symptome, wie Magenerweiterung, Magenbrennen, Mageninhaltsstauung diagnostizieren. Nach Ferrier ist auch bei der Zahnkaries der Kinder beim ersten Zahngebiß die Ursache in Diätfehlern und Verdauungsstörungen zu suchen.

Teissier und Charrin konnten Kalkverlust der Gewebe bei Tieren, die nach einer übermäßigen und unrationellen Fütterung an deutlichen Verdauungsbeschwerden litten, beobachten.

Loeper hat Kalkbestimmungen in den Faeces bei verschiedenen Magen- und Darmkrankheiten vorgenommen, mit dem Befunde, daß häufig der ausgeschiedene Kalk den eingeführten, besonders bei Enteritis und Oxallithiasis, an Menge übertrifft.

Bei Hyperchlorhydrie sind in dieser Richtung wenige und mangelhafte Untersuchungen gemacht worden: nur Loeper und Béchamp sahen, daß die Kalkmenge im Kot dabei 70 bis 90 und 140% des aufgenommenen Kalkes betragen kann, während der normale Mittelwert sich auf 50% beläuft.

Um an eine andere mögliche Ursache der vermehrten Kalkausscheidung zu erinnern, will ich die Tatsache erwähnen, daß Loeper in den Faeces einer Frau mit hochgradiger Acidität des Speichels 85% des eingeführten Kalkes und im Harn eine absolute tägliche Menge von 0,45 g CaO ermittelte. Es scheint also sicher, daß die Säurebildung im Magendarmkanal entweder durch übermäßige Gärung der Nahrung oder durch unregelmäßige Magensaftsekretion, wie auch durch Anomalien im intermediären Stoffwechsel Kalkverlust bedingen kann. Wie schon oben angedeutet, weisen die vorgenannten Arbeiten der französischen Autoren Mängel

und Unvollständigkeiten auf, namentlich was die Hyperchlorhydrie betrifft. Systematische Untersuchungen über den Kalkstoffwechsel bei dieser Krankheit sind noch nicht gemacht worden.

Diese Lücke sollten nun meine Untersuchungen ausfüllen. Vor allem habe ich die normalen Grenzen über den Ca- und Mg-Stoffwechsel bei Gesunden festzustellen gesucht, da darüber bei den verschiedenen Autoren keine völlige Übereinstimmung herrscht. In der folgenden Tabelle habe ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen an Gesunden nebst jenen von **Renvall** und **Bertram** zusammengestellt.

Autor	Diät	Gewicht	Alter	Einnahme		Harn			Kot			Bilanz	
		kg		CaO g	MgO g	CaO g	% des eingeführten Kalkes	MgO g	CaO g	% des eingeführten Kalkes	MgO g	CaO	MgO
Secchi	Milchdiät	69	20	4,80	0,72	0,458	9,60	0,226	2,56	53	0,54	+ 1,78	− 0,046
„	Milchdiät	57	70	3,65	0,52	0,342	9,36	0,162	1,61	44	0,339	+ 1,65	+ 0,02
„	Gemischte Diät	61	20	1,50	0,70	0,293	19,50	0,173	0,814	54	0,462	+ 0,393	+ 0,048
„	Gemischte Diät	56	62	0,70	0,50	0,214	30,0	0,138	0,39	55,70	0,416	+ 0,096	− 0,044
					Mg								
Renvall	Gemischte Diät	—	—	1,48	0,412	0,649	44,0	0,139	0,664	49	0,286	+ 0,173	− 0,013
„	Gemischte Diät	—	—	0,86	0,499	0,507	58,0	0,132	0,325	37	0,326	+ 0,028	+ 0,041
Bertram	Gemischte Diät	—	—	0,385	—	0,167	43,0	—	0,233	60	—	− 0,015	—

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, daß die durch den Harn ausgeschiedene Kalkmenge zwischen 9 und 58% des eingeführten Kalkes schwanken kann. Bei demselben Individuum hält sich aber die im Harn ausgeschiedene Kalkmenge, auch bei verschiedener Kalkzufuhr, auf fast konstanten Werten. Verschiedene Personen dagegen weichen in dieser Beziehung stark, auch bei gleicher Kalkzufuhr, voneinander ab. Einige Menschen können scheinbar nicht mehr als 0,10 bis 0,20 g CaO im Urin täglich ausscheiden, andere jedoch Mengen bis zu 1 g CaO. Hieraus kann man ohne weiteres verstehen, daß die Angaben über den Ca-Umsatz jener Autoren, die ihre Analysen auf den Harn beschränkt hatten, keinen Wert besitzen.

Größere Bedeutung hat hingegen die Ca-Abgabe durch den Kot.

Auf Grund meiner Untersuchungen darf man annehmen, daß die Kalkmenge der Faeces 40 bis 60% des dargereichten Kalkes entspricht.

Es muß aber betont werden, daß diese Zahlen keinen absoluten Wert darstellen, sondern immer im Verhältnis zur eingeführten Kalkmenge berechnet werden müssen. Bei kalkarmer Diät nähert sich also die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Kalkes derjenigen des eingenommenen, und bei kalkreicher Diät ist die resorbierte Kalkmenge im Verhältnis zum eingeführten Kalk immer kleiner, die Abgabe durch den Kot infolgedessen immer stärker.

Außerdem wissen wir, gestützt auf die Arbeiten von Forster, Zweifel, Blauberg und Schloßmann, daß der kindliche Organismus intensiv bestrebt ist, Kalk zurückzuhalten, während beim gesunden erwachsenen Menschen zweifellos eine Tendenz zum Ca-Gleichgewicht besteht. Aus der vorliegenden Tabelle ist auch ersichtlich, daß der Kalkumsatz bei verschiedener Einführung von 0,40 g bis auf 1,50 g CaO im Gleichgewicht bleibt. Außerhalb dieser Grenzen tritt bei Gesunden Ca-Verlust bzw. Ca-Ansatz ein.

Nach meinen analytischen Befunden lassen sich folgende Sätze für den Kalkstoffwechsel bei gesunden erwachsenen Menschen aufstellen:

1. Die durch den Kot ausgeschiedene Kalkmenge entspricht 40 bis 60% des eingeführten Kalkes.

2. Bei Einführung von 0,40 bis 1,50 g CaO bleibt die Bilanz im Gleichgewicht oder zeigt einen geringen Ca-Ansatz.

Manchmal wird auch die Kalkausscheidung durch den Harn von einiger Wichtigkeit sein. Wir haben schon gesagt, daß es Menschen gibt, die durch die Nieren nur eine sehr geringe Menge von Kalk ausscheiden; bei diesen wird natürlich die Ca-Abgabe durch den Kot 60% des eingeführten Kalkes übertreffen, ohne daß die Bilanz über die normalen Grenzen hinausgeht. Endlich ist von vielen Forschern dargetan worden, daß Art und Intensität des Kalkumsatzes auch von der Quantität und Qualität der Nahrung abhängt.

Zu einer richtigen Beurteilung über den Kalkstoffwechsel gelangt man folglich erst, wenn man alle vorgenannten Bedingungen und Modifikationsmomente auf das sorgfältigste berücksichtigt.

Was den Mg-Stoffwechsel betrifft, so stimmen meine Untersuchungen mit jenen von Renvall, Bunge und Bertram gut überein. Nach diesen Autoren ist das Magnesiumbedürfnis in

der Nahrung für den Erwachsenen auf höchstens 0,50 bis 0,60 g Mg pro die zu berechnen. Aus Bertrams Versuchen geht hervor, daß sich bei einer Einnahme von 0,73 g Mg stets eine, wenn auch geringe, positive Bilanz ergab, sowie aus Gramatchikows Versuchen, daß bei 0,40 bis 0,80 g Mg in der Regel ein Ansatz von Magnesium erfolgte.

Meine Versuche wurden an vier Fällen von Hyperchlorhydrie ausgeführt.

Versuch 1.

S. D., Bauer, 59 Jahre alt. Keine schweren Krankheiten in der Anamnese. Seit 6 Monaten Magenbeschwerden, Magendrücken, brennende Empfindung in der Magengegend und saures Aufstoßen. Appetit unverändert. Verstopfung. Kein Erbrechen. Ernährungszustand des Körpers gut. Gewicht 57 kg. Die Magenausspülung, morgens nüchtern, zeigt keinen Mageninhalt.

Probemahlzeit von Leube-Riegel, nach $2^1/_2$ Stunden ausgehebert. Menge 100 ccm. Gesamtacidität 3,88 ‰. Freie Salzsäure 1,35 ‰. Keine Milchsäure.

Patient genoß täglich: 200 g Milch, 200 g Kaffee, 200 g Rindfleisch, 30 g Butter, 180 g Weißbrot, 600 g Suppe, 500 g Wasser und 500 g Rotwein.

Tage	Einnahme		Harn			Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	Menge g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	6,23	3,45	1475	0,20	0,19	4,36	1,66	+ 0,686	+ 0,52
2			1550	0,198	0,195				
3			1460	0,182	0,20				
4			1135	0,19	0,188				
5			1220	0,204	0,24				
6			1350	0,21	0,258				

Versuch 2.

G. Ludwig, 31 Jahre alt. Seit einigen Jahren epigastrische Schmerzen nach der Mahlzeit, mit starkem brennenden Gefühl im Rachen. Die Schmerzen hörten nach Einnehmen von doppeltkohlensaurem Natron auf. Kein Erbrechen. Obstipation. Gesamternährung gut. Gewicht 60 kg.

Magenausspülung, morgens nüchtern, ergibt keinen Inhalt.

Probemahlzeit von Leube-Riegel, nach $2^1/_2$ Stunden herausgehebert; Menge 160 ccm. Gesamtacidität 3,75 ‰. Freie Salzsäure 1,20 %. Keine Milchsäure.

Patient genoß täglich: 500 g Rotwein, 200 g Weißbrot, 200 g Rindfleisch, 200 g Kaffee, 50 g Schinken, 600 g Suppe, 500 g Wasser.

Tage	Einnahme		Harn		Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	CaC g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	1,95	1,44	0,118	0,154	1,25	0,86	+ 0,367	+ 0,105
2			0,109	0,156				
3			0,106	0,159				

Versuch 3.

F. G., 58 Jahre alt. Seit 3 Jahren Magenbrennen und saures Aufstoßen nach den Mahlzeiten. Seit 6 Monaten Erbrechen von stark saurer Magenflüssigkeit, besonders während der Nacht. Einmal Magenblutung. Appetit gut. Verstopfung. Ernährungszustand schlecht. Gewicht 45,400 kg.

Bei Magenausspülung, morgens nüchtern, kein Inhalt.

Ewalds-Frühstück, nach 1 Stunde herausgehebert; Menge 70 g. Gesamtacidität 2,55 °/₀₀. Freie Salzsäure 1,80 °/₀₀. Keine Milchsäure.

Probemahlzeit von Leube-Riegel, nach $2^1/_2$ Stunden per Magensonde herausbefördert; Menge 170 g. Gesamtacidität 4,28 °/₀₀. Freie Salzsäure 2,04 °/₀₀. Keine Milchsäure.

Der Kalkstoffwechsel wurde nach kalkarmer und nach kalkreicher Diät untersucht.

Die Ergebnisse sind bei kalkarmer Diät folgende (240 g Weißbrot, 100 g Milch, 100 g Kaffee, 100 g Reis, 600 g Suppe, 200 g Rindfleisch, 800 g Wasser):

Tage	Einnahme		Harn		Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	2,16	1,038	0,282	0,132	3,16	1,06	— 1,83	— 0,413
2			0,269	0,128				
3			0,280	0,131				

Bei kalkreicher Diät (2000 g Milch, 3 Eier, 600 g Suppe):

Tage	Einnahme		Harn		Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	18,25	3,55	0,350	0,270	11,86	2,16	+ 4,65	+ 0,05
2			0,336	0,266				
3			0,340	0,272				
4			0,372	0,268				
5			0,345	0,271				

Versuch 4.

Kutscher, 67 Jahre alt. Während des Winters 1908 epigastrische Schmerzen nach den Mahlzeiten, später Besserung. Seit 2 Jahren wieder

Schmerzen. Seit 8 Monaten Erbrechen und einmal Magenblutung. Gesamternährung schlecht. Gewicht 47 kg.

Bei der Magenausspülung, morgens nüchtern, wurde eine große Menge von Mageninhalt gewonnen. Gesamtacidität 3,17 ‰. Freie Salzsäure 2,73 ‰. Milchsäure-Reaktion kaum positiv.

Probemahlzeit von Leube-Riegel, nach 2 ½ Stunden herausgehebert; Menge 200 g. Gesamtacidität 4,0 ‰. Freie Salzsäure 2,20 ‰. Keine Milchsäure.

Webers Blutreaktion in den Faeces positiv.

Nach einigen Magenausspülungen bessert sich die Motilität des Magens, und morgens findet man im Magen nur eine kleine Menge von Magensaft.

Die Resultate des Ca- und Mg-Umsatzes sind folgende:

Bei kalkarmer Diät (600 g Milch, 200 g Kaffee, 120 g Weißbrot, 4 Eier, 50 g Rindfleisch, 10 g Butter):

Tage	Einnahme		Harn		Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	4,560	0,790	0,313	0,181	3,870	0,720	−0,300	−0,458
2			0,340	0,174				
3			0,340	0,172				

Bei kalkreicher Diät (2000 g Milch, 2 Eier, 600 g Suppe):

Tage	Einnahme		Harn		Kot		Bilanz	
	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g	CaO g	MgO g
1	10,83	2,16	0,426	0,174	6,89	1,98	+2,64	−0,35
2			0,450	0,182				
3			0,432	0,173				

Wenn wir nun vorliegende Untersuchungen kritisch betrachten, so finden wir, daß der Ca- und Mg-Umsatz sich bei den ersten Kranken wesentlich verschieden von dem der letzteren verhielt.

In dem ersten Falle, bei täglicher Zufuhr von 1,0 g CaO, wurden durch den Harn 18 %, durch den Kot 64 % des eingeführten Kalkes ausgeschieden. Die Ca-Bilanz zeigte einen täglichen Ansatz von 0,16 g CaO. Obwohl die Kalkmenge der Faeces 60 % des eingenommenen Kalkes übertrifft, kann man hier den Ca-Stoffwechsel als einen normalen ansprechen.

Ebensowenig stellte sich ein Mg-Verlust ein, da die Mg-Bilanz sich auch bei der kleinen Dosis von 0,53 g Mg positiv verhielt.

Im zweiten Falle, bei täglicher Zufuhr von von 0,65 g CaO, fanden sich im Harn 16,90%, im Kot 64% des einverleibten Kalkes wieder. Die Bilanz zeigte einen täglichen Ansatz von 0,123 g CaO. Auch hier übersteigt die Kalkmenge im Kot also kaum die von uns festgestellte normale Grenze. Die Ca-Abgabe durch den Harn ist jedoch so klein, daß die Ca-Bilanz völlig der Norm entspricht. Was den Mg-Umsatz betrifft, so finden wir eine positive Bilanz bei täglicher Zufuhr von 0,48 g MgO. Also handelte es sich nicht um Mg-Verlust, vielleicht eher um eine gewisse Mg-Retention.

Ganz verschieden fallen die Ergebnisse bei den zuletzt genannten Patienten aus.

In dem dritten Falle, bei kalkarmer Diät, wurden durch den Harn 38%, durch den Kot 146% des eingeführten Kalkes ausgeschieden. Also hat die Ca-Abgabe die Kalkzufuhr wesentlich übertroffen, und die Bilanz zeigte infolgedessen einen täglichen Verlust von 0,61 g CaO. Daraus geht mit Sicherheit hervor, daß hier ein unregelmäßiger Ca-Verlust vorlag. Bei kalkreicher Diät hat sich die Ca-Ausscheidung durch den Kot innerhalb der normalen Grenzen gehalten.

In bezug auf den Mg-Stoffwechsel war keine Veränderung desselben zu konstatieren, da der Kranke sich im Gleichgewicht bei täglicher Einführung von 0,71 g MgO verhielt. Dies steht mit den Ergebnissen Renvals und Bertrams und mit den meinigen völlig im Einklang.

In dem vierten Falle wurden während der ersten Diät durch den Harn 21,70%, durch den Kot 85% des in der Nahrung vorhandenen Kalkes ausgeschieden. Die Bilanz zeigte einen täglichen Verlust von 0,10 g CaO. Bei kalkreicher Diät war die Ca-Abgabe durch den Kot kaum höher als die Norm in den beobachteten Werten (63,70% des eingeführten Kalkes). Auch in diesem Falle war also eine übermäßige Kalkausscheidung vorhanden, da der Kranke eine negative Bilanz bei Verabreichung von 1,52 g CaO aufwies. Vielleicht übertraf auch die Mg-Ausscheidung die normale Menge, da bei Zufuhr von 0,72 g MgO deutlicher Mg-Verlust sich einstellte.

Man kann nun die Frage aufwerfen, ob die bei den letzteren Kranken beobachtete Ca-Ausscheidung von Hyperchlorhydrie kausal abhängig sei.

Gegen diese Annahme sprechen zwei Überlegungen:

1. Bei den ersten Kranken, mit ausgesprochener Hyperchlorhydrie, verhielt sich die Ca-Bilanz wie bei Gesunden.

2. Bei den anderen Patienten kann der bestehende schlechte Ernährungszustand den Kalkverlust erklären, da Beneke bei fast allen Zuständen chronischer Unterernährung auffallend große Mengen von Ca- und Mg-Salzen im Harn gefunden hat.

Außerdem möchte ich erwähnen, daß ich bei einem Falle von Anachlorhydrie normalen Ca-Umsatz zu beobachten Gelegenheit hatte. Bei diesem Kranken war von einer Unterernährung nicht die Rede. Es läßt sich daraus schließen, daß, während die Salzsäurezufuhr prägnanten Einfluß auf den Ca- und Mg-Umsatz ausübt, die Salzsäure des Magensaftes, wenigstens in geringer Menge, keine ähnliche Wirkung besitzt.

Diese Erscheinung harmoniert mit der folgenden, durch zahlreiche Untersuchungen gestützten Tatsache, daß die Salzsäurezufuhr die Indicanausscheidung durch den Harn vermindert. Man könnte nun vermuten, daß auch die Vermehrung der Salzsäure bei Hyperchlorhydrie ähnliche Wirkung entfaltet. Jedoch fanden Senator, Sokwis, Jaffé, Hennige u. a. bei Hyperchlorhydrie und Magengeschwüren deutlich vermehrte Indicanmengen im Harn. Auch hier sind also die Wirkungen der Salzsäurezufuhr und der Magensalzsäure nicht identisch.

Meiner Ansicht nach ist diese Tatsache auf folgende Umstände zurückzuführen:

1. Bei einigen Fällen von Hyperchlorhydrie kann man die Gesamtmenge der im Magen abgesonderten Salzsäure nicht genau berechnen. Also kann es sich dabei nicht um eine absolute Vermehrung der Salzsäure, sondern um eine schnellere Absonderung der Magendrüsen handeln. Es können alle klinischen Symptome der Hyperchlorhydrie eintreten, ohne die Mineralausscheidung zu modifizieren.

2. Wie wir wissen, entsteht die Magensalzsäure durch Spaltung des Chlorsalzes im Blute. Parallel mit der im Magen abgesonderten Säuremenge (Chlor) ergießt sich eine entsprechende Alkalimenge (Natrium) ins Blut. Es handelt sich also bei Hyperchlorhydrie nicht um eine wahre Vermehrung der Säuren im Körper, sondern nur um eine Trennung der Säuremoleküle von den Alkalimolekülen.

Außerdem kann die Magensalzsäure während der Verdauungsperiode organische und anorganische Verbindungen mit der Nahrung eingehen. Endlich kann der Speichel, der bei diesen Kranken gewöhnlich in großer Menge vorhanden ist, einen Teil der Magensalzsäure neutralisieren.

Um kurz zu rekapitulieren: in den vorliegenden Versuchen ist beobachtet worden, daß die im Magen abgesonderte Salzsäure, wenigstens in bestimmten Grenzen, keinen Einfluß auf den Ca- und Mg-Stoffwechsel ausübt. Jedoch ist die Tatsache nicht auszuschließen, daß schwere Säurehypersekretion der Magendrüsen, mit allen begleitenden Verdauungsstörungen, eine deutliche Veränderung des Mineralstoffwechsels zu bewirken vermag.

Über die Nuclease des Serums Gravider und Nephritiker.

Von

Nina Kotschneff.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Kaiserl. Instituts für experimentelle Medizin in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 22. Juni 1914.)

Nuclease ist den neueren Anschauungen nach der Sammelname für eine ganze Reihe spezifisch wirkender Fermente, welche die Nucleinsäure stufenweise bis zu ihren Bausteinen — Purin- und Pyrimidinbasen, Phosphorsäure und Kohlenhydraten spalten. Im Organismus beginnt die Wirkung der Nucleasen, nachdem die Nucleinsäure des Nucleoproteids von den Eiweißkomponenten durch proteolytische Fermente losgelöst ist. Der Abbau der Nucleinsäure geschieht in einer gewissen Reihenfolge, und die Möglichkeit der Wirkung eines jeden Fermentes ist durch die Tätigkeit des vorhergehenden bedingt. Zuerst spaltet die Nucleinase die Nucleinsäure, die als ein Polynucleotid betrachtet werden kann, in einzelne Nucleotide, die durch die Nucleotidase in freie Phosphorsäure, Purin- und Pyrimidinnucleoside abgebaut werden; diese letzteren spaltet die Nucleosidase in Purin- und Pyrimidinbasen und freies Kohlenhydrat. Nucleinase, Nucleotidase und Nucleosidase sind jedoch nach P. Levene und F. Medigreceanu[1]) ebenfalls Sammelnamen für ähnlich wirkende Fermente.

Die nucleolytische Wirkung des Serums und der Organe ist für den Stoffwechsel von großer Bedeutung und zeigt bei verschiedenen pathologischen Zuständen mehr oder weniger erhebliche Veränderungen. Die individuellen Schwankungen in der Norm sind nicht immer gering. Pighini fand eine Abnahme der Nuclease bei Alkoholismus und Epilepsie[2]), Juschtschenko bei Idiotismus[3]), Wolter dagegen konstatierte eine Steigerung der Nuclease bei Tuberkulose und Carcinom[4]).

---

[1]) P. Levene und F. Medigreceanu, Journ. of Biolog. Chem. **9**, 1911.

[2]) Pighini, diese Zeitschr. **33**, 190, 1911.

[3]) Juschtschenko, diese Zeitschr. **31**, 377.

[4]) Wolter, Zur Frage nach den Enzymen des Blutes bei Tuberkulose. Dissertation 1913, St. Petersburg.

Wir bestimmten die Nuclease in Seren normaler Menschen, Nephritiker und bei Graviden in verschiedenen Monaten der Schwangerschaft. Da bei Gravidität öfters Nephritis konstatiert wird, ist die nucleolytische Wirkung des Serums Gravider und Nephritiker von besonderem Interesse.

Wir bedienten uns der optischen Methode und benutzten einen Polarisationsapparat nach Landolt mit einer Nernstlampe als Lichtquelle unter Einschaltung eines geradsichtigen Spektroskops als Monochromator. Das Serum (0,5 ccm) wurde mit 10 ccm einer 2 %igen Lösung von hefenucleinsaurem Natrium gemischt und direkt in einem 100 mm langen Beobachtungsrohr für 24 Stunden in den Thermostaten gestellt, und das Drehungsvermögen im Anfang des Versuchs und nach Verlauf der 24 Stunden bei ein und derselben Temperatur bestimmt. Die Resultate unserer Untersuchungen sind in folgenden Tabellen dargestellt.

Nuclease in Seren normaler Menschen.

Nr.		Erste Ablesung	Letzte Ablesung	Differenz
1	Männer	1,98	2,27	0,71
2	„	2,01	1,24	0,77
3	„	2,02	1,32	0,70
4	„	1,96	1,23	0,73
5	„	1,94	1,12	0,82
6	„	2,01	1,36	0,65
7	Frauen	1,98	1,22	0,76
8	„	2,06	1,31	0,75
9	„	1,98	1,30	0,68
10	„	2,06	1,34	0,72
11	„	1,97	1,24	0,73
12	„	1,92	1,13	0,79
13	„	1,99	1,18	0,81

Nuclease in Seren Gravider.

Nr.	Zeit der Blutentnahme Schwangerschaft	Erste Ablesung	Letzte Ablesung	Differenz
1	3. Monat	1,98	1,14	0,84
2	3. „	1,94	1,16	0,78
3	4. „	1,97	1,15	0,82
4	4. „	2,01	1,17	0,84
5	5. „	2,03	1,17	0,86
6	5. „	2,01	1,23	0,78
7	6. „	1,90	1,02	0,88

Nr.	Zeit der Blutentnahme Schwangerschaft	Erste Ablesung	Letzte Ablesung	Differenz
8	9. Monat	1,95	1,03	0,92
9	Vor Geburt	2,15	1,18	0,97
10	" "	2,08	1,04	1,04
11	" "	2,14	1,16	0,98
12		1,90	0,94	0,96
13		1,90	0,87	1,03
14		1,95	0,94	1,01
15		2,04	1,15	0,89
16		2,00	1,08	0,92
17		2,01	1,11	0,90
18		1,81	0,84	0,97
19		2,01	1,09	0,92
20		2,01	0,98	1,03
21		1,93	1,03	0,90
22		2,07	1,22	0,85
23		2,08	1,20	0,88
24		2,04	1,22	0,82
52		2,02	1,11	0,91

Nuclease in Seren von Nephritikern.

Nr.		Erste Ablesung	Letzte Ablesung	Differenz
1	Männer	2,02	1,24	0,78
2	"	1,99	1,16	0,83
3	"	1,94	1,19	0,75
4	"	1,98	1,20	0,78
5	"	2,08	1,26	0,82
6	"	2,04	1,26	0,78
7	"	1,97	1,20	0,77
8	"	1,90	1,12	0,78
9	"	1,98	1,18	0,80
10	"	2,09	1,37	0,72
11	"	2,03	1,21	0,82
12	"	2,06	1,33	0,73
13	"	1,95	1,19	0,76
14	Frauen	1,98	1,18	0,80
15	"	1.96	1,22	0,74
16	"	2,01	1,19	0,72

Zusammenfassung.

In 16 Nephritisfällen konnten keine wesentlichen Abweichungen in der nucleolytischen Wirkung des Serums konstatiert werden.

Bei 25 Graviden wurde eine geringe im Anfang der Schwangerschaft beginnende, zum Schluß zunehmende Steigerung der nucleolytischen Wirkung des Serums beobachtet.

Über Pflanzenenzyme.

II. Die Amylase der Kartoffelknolle[1]).

Von

G. Doby.

(Aus der kgl. ungarischen agrikulturchemischen Versuchsstation zu Magyaróvár[2]).

(Eingegangen am 30. Juni 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Unsere Kenntnisse über die Amylase der Kartoffel sind noch sehr lückenhaft.

Zu allererst wurde das Vorkommen dieses Enzyms in keimenden Kartoffelknollen in den dreißiger Jahren des vorigen Jahrhunderts von Payen und Persoz erwähnt[3]). Später befaßte sich Baranetzky[4]) mit diesem Ferment, konnte es jedoch nur im autolysierten Safte der Kartoffel nachweisen. Bei seinen Versuchen über die Zuckerbildung in Pflanzen bei niederen Temperaturen kommt Müller-Thurgau[5]) auch zu der Meinung, daß in ruhenden Kartoffelknollen keine Diastase vorhanden sei und die Zuckerbildung durch irgendeinen anderen Grund verursacht würde. Neuere Forscher erwähnen nur ganz kurz, in Kartoffelknollen sei auch Diastase vorhanden, so Chrzaszcz[6]), Kostytschew[7]), während Heinzelmann[8]) die Maischversuche von Windisch und Jetter[9]), in denen diese aus einer Kartoffelmaische geringe Mengen

---

[1]) Vorgelegt der mathem.-naturwissensch. Klasse d. Ung. Akad. d. Wiss. im Mai 1914.

[2]) Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im chemischen Laboratorium der kgl. ung. pflanzenzenphysiol. u. -pathol. Versuchsstation vollendet.

[3]) Payen und Persoz, Ann. de chim. phys. **53**, 73 und **56**, 337, 1834.

[4]) Baranetzky, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen S. 57, 1878.

[5]) Müller-Thurgau, Landwirtschaftl. Jahrb. 1882 und **1885**.

[6]) Chrzaszcz, Wochenschr. f. Brauerei **25**, 105, 1908.

[7]) Kostytschew, Ber. d. botan. Ges. **31**, 125, 1913.

[8]) Heinzelmann, Zeitschr. f. Spiritusindustrie **31**, 12, 1908.

[9]) Windisch und Jetter, Zeitschr. f. Spiritusindustr. **30**, 554, 1907.

Alkohol erhielten, nicht durch die Anwesenheit von Diastase, sondern durch das Vorhandensein einer geringen Menge Zucker in den Knollen zu erklären glaubt. Mit seiner schönen capillaranalytischen Methode fand Grüß[1]) in verwundeten Knollen Diastase, erwähnt aber, dieselbe nur dann nachweisen zu können, wenn die Korkschicht an der verwundeten Stelle eine gewisse Dicke erreicht habe. Schließlich ist noch einer Meinung Massees[2]) zu gedenken, nach der die hochgezüchteten Kartoffelsorten weniger Diastase enthalten sollen, als die weniger veredelten.

Aus alledem ist ersichtlich, daß es noch zweifelhaft war, ob in ruhenden Kartoffeln überhaupt amylolytische Fermente vorhanden seien.

Mit meinen weiter beschriebenen Versuchen, die ich noch Ende 1912 mit dem Preßsafte von Kartoffeln ausführte, konnte ich vor allem ganz allgemein feststellen, daß Amylase auch in den ruhenden Kartoffelknollen immer vorhanden ist, wenn auch ihre Konzentration bei weitem hinter jener der Cerealiensamen bleibt. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms war bei meinen Versuchsbedingungen bei 40^{0}, also viel niedriger, als die meisten Amylasen ruhender Pflanzen aufweisen[3]). Die Kartoffelamylase wird bei 100^{0} gänzlich zerstört.

Am auffallendsten ist unter ihren Aktivatoren das Natriumfluorid, das die Wirkung des Enzyms in einer 2,1$^{0}/_{0}$igen Lösung auf das Dreifache erhöhte. Dieses Salz aktiviert z. B. auch die Amylase des Malzes[4]), dagegen wirkt es auf tierische Amylasen im allgemeinen hemmend. Meine Versuche zeigten also, daß in ruhenden Kartoffeln ein durch Fluornatrium aktivierbares Zymogen der Amylase in beträchtlicher Menge vorhanden ist.

Einen mehr oder weniger hemmenden Einfluß übt das reine Chlornatrium, das Dikaliumhydro- und das Kaliumdihydrophosphat aus, während sich salpetersaures Kalium indifferent verhält. Wahrscheinlich wird das dialysierte Enzym ein anderes Verhalten zeigen. Das Wasserstoff- und Hydroxylion wirkt nur in sehr geringer Konzentration aktivierend, höhere Konzentrationen hemmen.

---

[1]) Grüß, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 17, 76, 1907.

[2]) Massee, zit. nach Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 20, 99, 1910. Das Original stand mir leider nicht zur Verfügung.

[3]) Siehe z. B. die Amylase des Hafers bei Klempin, diese Zeitschr. 10, 210, 1908.

[4]) Abderhalden, Biochem. Handlexikon 5, 558.

Einen aktivierenden Einfluß übt auch der aufgekochte Saft der Kartoffel aus; eine ähnliche Aktivierung durch die aufgekochte Originallösung erwähnt z. B. auch Mohr[1]) beim Malz und schreibt sie Säuren oder Amiden zu. Ähnliche Erscheinungen fanden dann noch Wirth und Lintner[2]) sowie van Laer[3]). Wirth und Lintner meinen jedoch, daß an dieser Aktivierung verschiedene anorganische und organische Bestandteile der Flüssigkeit beteiligt sein könnten, welcher Meinung ich mich auch anschließe.

Der durch Ton filtrierte Saft der Kartoffelknollen verlor sein amylolytisches Vermögen.

Insbesondere interessierte mich die Frage, welchen paralysierenden Einfluß die Konstitution und Konfiguration verschiedener Zucker auf die Kartoffelamylase ausüben.

Mit der hemmenden Wirkung verschiedener Zucker auf Amylase beschäftigten sich schon viele Forscher. Unter den ersten ist Baranetzky[4]) zu nennen, der den paralysierenden Einfluß von Glucose bewies, welchen Einfluß auf den Vorgang der Zuckerbildung in Pflanzen die Versuche Müller-Thurgaus[5]) bestätigten. In neuerer Zeit befaßten sich Wohl und Glimm in einer eingehenden Arbeit[6]) mit der hemmenden Wirkung verschiedener Zucker auf Mercksche Diastase. Sie kamen zu dem Schluß, daß für den paralysierenden Einfluß vor allem die Aldehydgruppe des Zuckers verantwortlich zu machen sei.

In meinen Versuchen wendete ich die Zucker in molarer Konzentration an, wozu ich durch folgende Überlegung gelangte: Die hemmende Wirkung ist mit größter Wahrscheinlichkeit einer adsorptionsartigen Bindung des Enzyms seitens der hemmenden Verbindung zuzuschreiben[7]), wodurch dann schließlich

---

[1]) Mohr, Wochenschr. f. Brauerei 22, 501, 1905.

[2]) Wirth und Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **31**, 421 bis 425, 1908.

[3]) van Laer, Bull. Acad. Roy. Belg. **1913**, 440.

[4]) Baranetzky, l. c. 31 bei Brassica Rapa.

[5]) Müller-Thurgau, Landwirtschaftl. Jahrb. **1885**, 795.

[6]) Wohl und Glimm, diese Zeitschr. 27, 349, 1910.

[7]) Bayliss, Chem. Centralbl. 2, 1095, 1911. — van Laer, Bull. Acad. Roy. Belg. **1911**, 824, besonders bei Diastase und Maltose, sowie Diastase und Stärke. Hingegen äußert sich Starkenstein, diese Zeitschr. **24**, 217, 1910, gegen das Bestehen ähnlicher Verbindungen.

Reversionserscheinungen, Synthesen zustande kommen könnten[1]. Zu diesen ist aber in erster Linie die Aldehyd- bzw. Ketongruppe der Zucker geeignet, und daher ist die Konzentration dieser Gruppen von ausschlaggebender Bedeutung. In meinen Versuchen zeigte sich die hemmende Wirkung der Zucker in ansteigender Reihenfolge, wie folgt:

Mannose,
Galaktose, Rohrzucker,
Arabinose
Fructose, Milchzucker,
Glucose,
Maltose.

Die Reihenfolge weist darauf hin, daß die Amylase in erster Linie durch ihre eigenen Spaltungsprodukte, die Maltose und Glucose, in ihrer Wirkung gehemmt wird, und zwar durch das nächstliegende Spaltungsprodukt, die Maltose, am stärksten. Aus diesen Versuchen geht weiter mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß bei solchen natürlichen Enzymsystemen[2], die ich in meinen Versuchen anwendete, die Reaktion in erster Linie durch die Spaltungsprodukte des Substrates, in zweiter Linie aber durch jene Zucker gehemmt wird, die im betreffenden Pflanzenteile, in diesem Falle also in den Kartoffelknollen, frei oder gebunden vorkommen. In den Pflanzenteilen ist bekanntlich eine ganze Reihe von Enzymen bzw. Katalysatoren vorhanden, welche die Hydrolyse der Stärke und die Umwandlung ihrer Produkte stufenweise vermitteln und zu denen die Amylase, die Amylopektinase, etwa die Dextrinase, die Maltase, Invertase, vielleicht eine Glucosidase, Arabane und Galaktane hydrolysierende Enzyme usw. zu rechnen wären. Dieselben Enzyme (bei der Kondensation der höchsten Stufe der Stärke etwa die Amylokoagulase) vermitteln aber infolge der Änderung der Konzentration, Temperatur usw. auch den entgegengesetzten Vorgang, die Kondensierung, und daher ist es

---

[1]) Außer den älteren Arbeiten dieser Richtung von Croft-Hill, E. Fischer, Armstrong, Emmerling usw. beweist dies besonders neuerdings eine ganze Reihe schöner enzymatischer Glucosidsynthesen Bourquelots, Hérisseys und Bridels im Journ. de Pharm. et de Chim. 1912 und 1913.

[2]) Euler und Kulberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 14, 1910.

verständlich, wenn die Wirkung des natürlichen Enzymsystems der Kartoffelamylase vorerst durch die Produkte der Stärkehydrolyse, dann aber auch durch andere Polysaccharide bzw. deren Spaltungsprodukte gehindert wird. Daher hemmt am stärksten die Maltose, dann die Glucose usw., und darum ist die Mannose unwirksam. Bei Disacchariden kommt es dann in zweiter Linie auf das Reduktionsvermögen an; hieraus folgt, daß der reduzierende, obzwar völlig artfremde Milchzucker stärker hemmt als der Rohrzucker, der an und für sich vielleicht gar keine Wirkung hätte, wenn er durch die geringe, im Kartoffelsaft vorhandene Menge Invertase nicht in Glucose und Fructose gespalten würde, deren langsames Entstehen die hemmende Wirkung des Rohrzuckers vortäuscht.

Die paralysierende Wirkung der Zucker scheint aber in keinem Zusammenhange damit zu sein, ob die Zucker der Dulcit- oder Mannitreihe angehören.

Reiht man die Zucker in den Versuchen Wohl und Glimms nicht nach prozentischer, sondern nach molarer Konzentration, so erhält man folgende Reihe:

Fructose,
Rohrzucker,
Mannose,
Galaktose,
Glucose,
Maltose.

In diesem Falle ist also auch hier die Maltose der am stärksten hemmende Zucker, wogegen die Fructose so indifferent ist, wie in meinen Versuchen die Mannose, während der Rohrzucker etwa den gleichen Einfluß ausübt. Die Verschiedenheit der Wirkung einiger Zucker in den Versuchen Wohl und Glimms und in den meinen ist besonders bei der Fructose und Mannose auffallend, wodurch ich zu dem Schlusse geführt wurde, daß die hemmende Wirkung nicht von dem Aldose-Charakter, sondern von verwickelteren Verhältnissen abhängt, die ich oben zu skizzieren versuchte. Es wäre also die erwähnte Verschiedenheit auf zweierlei Gründe zurückzuführen: Entweder waren in den zweierlei Enzymlösungen verschiedene einzelne Enzyme vorhanden, oder die molekulare Konstitution der Amylase war verschieden.

Es besteht heute noch völlige Ungewißheit darüber, ob die molekulare Konstitution der, von verschiedenen Arten stammenden, gleichnamigen Enzyme gleichartig oder verschieden sei: Vor allem hält es E. Fischer für möglich[1]), daß gleichartige Enzyme das einemal mehr, das anderemal weniger aktive Atomgruppen enthalten. Man könnte die Einheitlichkeit oder Verschiedenheit solcher Enzyme verschiedener Abstammung dadurch näher erforschen, wenn man die paralysierende oder aktivierende Wirkung fremder Substanzen verschiedener Konstitution oder Konfiguration einmal auf die natürlichen Enzymsysteme, dann aber auf die gereinigten Enzyme untersuchen würde. Die Verwertung der Wirkung der Paralysatoren zur Erforschung der Konfiguration der Enzyme schlug schon Armstrong[2]) vor. Ich werde mich mit der Untersuchung dieser Verhältnisse bei anderen Enzymen näher befassen, bei denen das Messen der fortschreitenden Reaktion exakter und die Verhältnisse daher einfacher sind.

Es gelang mir weiter festzustellen, daß der Verlauf der Reaktion der Kartoffelamylase auch der Schützschen[3]) Regel folgt, ebenso wie z. B. die Haferamylase[4]).

Schließlich dehnte ich meine Versuche noch in der Richtung aus, ob das Enzymsystem der Kartoffelamylase beim sterilen Aufbewahren, also infolge von Autolyse, an Aktivität zunimmt. Schon Baranetzky[5]) machte ähnliche Versuche, dieselben waren aber in betreff des Messens des Umfanges der Reaktion, wie auch betreffs der Sterilität des Kartoffelsaftes derart, daß jedenfalls exakte Feststellungen nötig waren. Es zeigte sich nun, daß die Amylase der ruhenden Kartoffelknollen an Aktivität tatsächlich zunahm, um dann wieder allmählich eine Schwächung zu erleiden. Diese Verhältnisse sollen dann in breiterer Ausführung in einer nächsten Arbeit in Gemeinschaft mit J. Bodnár besprochen werden.

---

[1]) E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 76, 1898.

[2]) Zitiert nach Wochenschr. f. Brauerei 22, 701, 1905.

[3]) Schütz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 577, 1884. — Schütz und Huppert, Arch. f. d. ges. Physiol. 80, 470, 1900.

[4]) Klempin, l. c.

[5]) Baranetzky, l. c. S. 57.

Zum Schluß möchte ich noch darauf hindeuten, daß meine Untersuchungen eine endgültige Erklärung der Zuckerbildung durch Abkühlen gewisser Pflanzenorgane ermöglichen. Entgegen der schon erwähnten Behauptung Müller-Thurgaus kann nun aus meinen Versuchen der Schluß gezogen werden, daß die Amylase auch beim Vorgange der Zuckerbildung aus Stärke infolge von Abkühlung der Pflanzenorgane in Gemeinschaft mit anderen Enzymen der Vermittler der Zuckerbildung ist. Dieser, sowie der entgegengesetzte Vorgang wird in den Knollen langsam fortwährend fortschreiten, aber je nach der Temperatur, den Konzentrations-, den osmotischen usw. Verhältnissen entweder der eine oder der andere Vorgang überwiegen, was dann das Vorhandensein nur des einen oder des anderen vortäuscht. Hiermit steht auch das verhältnismäßig niedrige Temperaturoptimum der Kartoffelamylase in gutem Einklang.

Experimentelles.

Der Zweck meiner Untersuchungen war vor allem die Eigenschaften des natürlichen Enzymsystems der Kartoffelamylase kennen zu lernen und dabei dasselbe nach Möglichkeit unverändert zu erhalten; daher benutzte ich als Enzymlösung den aus den Kartoffelknollen gewonnenen Saft. Hierzu wurden die äußerlich gereinigten Knollen in einer Fleischhackmaschine zerkleinert, der Saft durch Batist abgepreßt, zentrifugiert, durch Asbest abgesaugt und mit Toluol steril erhalten.

Da der Name „Diastase" einen Sammelbegriff vorstellt, wählte ich als Untersuchungsobjekt bloß die Amylase und untersuchte darum die hydrolysierende Wirkung des Kartoffelsaftes auf lösliche Stärke, die als das lösliche Homologe der Amylase im Sinne Maquennes anzusprechen ist. Als Methode wählte ich die Wohlgemuthsche[1]) mit der Klempinschen[2]) Änderung des gleichen Auffüllens aller Reagensgläser, da es sich in einem Vorversuche herausstellte, daß bei derselben Menge des Enzyms die Konzentration desselben von großer Bedeutung ist, wie dies aus folgender Zusammenstellung erhellt:

---

[1]) Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

[2]) Klempin, l. c.

1.

Gesamtvolumen der Reaktionsflüssigkeit ccm	L bei Enzymflüssigkeit ccm	$D^{40°}_{24h}$	Relative Aktivität
5	0,4	2,0	120
10	0,5	1,67	100
20	0,7	1,25	75

Die Intervalle zwischen den Gliedern einer Reihe wurden meistens mit je 0,1 ccm bemessen. In manchen Versuchen, besonders bei höheren (1,5 bis 2 ccm) Enzymkonzentrationen schied sich im Laufe der Reaktion ein leichter, flockiger Niederschlag aus, von dem man die überstehende Flüssigkeit meistens mit einer Pipette schön abziehen konnte. Der Rest enthielt keine Stärke[1]). Die Dauer der Versuche wurde bei 40° (im Brutschrank) zu 24 Stunden bemessen, ausgenommen bei der Feststellung der Zeitregel und des Temperaturoptimums; bei letzterem aus dem Grunde, da es ohne die entsprechende Zahl Brutschränke unmöglich gewesen wäre, die verschiedenen nötigen Temperaturen 24 Stunden hindurch zu erhalten. Als Antisepticum verwendete ich Fluornatrium in 0,3%iger Konzentration, da sich Toluol zu rasch und ungleichmäßig verflüchtigte. Das Gesamtvolumen der Reaktionsflüssigkeiten betrug in den Fällen, wo nähere Angaben nicht gemacht werden, 10 ccm mit 1 ccm 1%iger Kahlbaumscher löslicher Stärke.

Nachweis der Amylase in ruhenden Knollen. Die Versuche wurden vom November 1912 bis Mitte Januar 1913 ausgeführt, also in einer Periode, wo die Knollen noch ihren vollen Winterschlaf schliefen. Die Gegenwart der Amylase wird am besten durch die nächste Zusammenstellung bewiesen, welche die nach 24 Stunden erhaltenen Ergebnisse enthält[2]):

Gläschen	1%ige Stärkelösung ccm	Enzymlösung ccm	H_2O ccm	Farbenton mit 2 Tropfen $^n/_{10}$-J-Lösung
1	1	0,5	18,5	dunkelblau
2	1	1,0	18,0	violett
3	1	2,0	17,5	braun

[1]) Starkenstein, diese Zeitschr. 24, 194, 1910. — Schirokauer und Wilenko, diese Zeitschr. 33, 278, 1911.

[2]) Hier wurde als Antisepticum ausnahmsweise Toluol angewendet.

Dagegen blieben die mit vorher aufgekochter Enzymlösung angestellten Reaktionsflüssigkeiten ausnahmslos intensiv dunkelblau gefärbt. Dieses Ergebnis samt den weiter zu beschreibenden weist unzweideutig auf die Gegenwart von Amylase.

Das Temperaturoptimum der Amylase. Für die weiteren Versuche mußte ich vor allem das Temperaturoptimum dieser Amylase kennen. Die Dauer der diesbezüglichen Versuche war — wie schon erwähnt — 1 Stunde. Die Ergebnisse sind folgende:

Temperatur	L	D_{60}	Relative Aktivität
11°	3,0	0,32	68
20°	2,2	0,43	91
30°	2,1	0,45	96
40°	2,0	0,47	100
45°	2,8	0,34	72
50°	4,0	0,24	51
55°	4,6	0,21	45
60°	6,5	0,14	30
80°	10,9	0,09	19

Am übersichtlichsten sind diese Angaben durch beistehende Kurve (Fig. 1) dargestellt.

Es zeigt sich also, daß das Temperaturoptimum der Kartoffelamylase ziemlich niedrig, bei 40° liegt und 60 % der bei dieser Temperatur erreichten Aktivität sind schon bei etwa 8° vorhanden. Dagegen ist dieses Enzym gegen höhere Temperaturen äußerst empfindlich, so daß es z. B. bei 45° nur halb so wirksam ist wie bei 11°, und bei 60° büßt es schon etwa 70 % seiner größten Aktivität ein. — Das ermittelte Optimum ist natürlich ebenso wenig streng charakteristisch, wie das aller anderer Enzyme. Daß jedoch die Optimaltemperatur nicht bloß bei den einstündigen, sondern auch bei Versuchen viel längerer Dauer dieselbe bleibt, geht

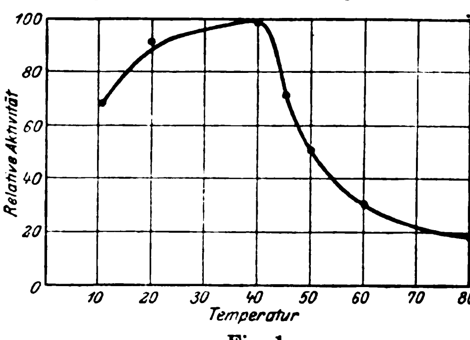


Fig. 1.

aus den später zu erwähnenden Versuchen betreffs des zeitlichen Verlaufes der Reaktion hervor.

Aus diesen Angaben folgt weiter, daß das Verhältnis $\frac{K_t}{K_{t-10}}$ in meinen Versuchen stets kleiner war als 2, was wieder ein Beweis der großen Empfindlichkeit dieser Amylase ist. Bei Malzamylase ist $\frac{K_{35}}{K_{25}}$ z. B. beiläufig 2.[1])

Die durch Ton filtrierte Amylase büßt ihre Wirkung völlig ein; zu diesem Zweck wurde der Kartoffelsaft durch ein kleines, bei 140° sterilisiertes Pukallsches Filter gesaugt. Eine mit 1,5 ccm dieser Lösung angestellte Flüssigkeit färbte sich mit J nach 24 stündigem Verdauen intensiv dunkelblau, während von demselben, nicht filtriertem Saft unter denselben Bedingungen 0,6 ccm zur völligen Hydrolyse ausreichten.

Wirkung des Fluornatriums. Diese Versuche wurden mit Toluol vor Infektion bewahrt. Das Fluornatrium — Kahlbaumsches, reinstes Präparat — wurde in 3 %iger Lösung abgemessen. Die Ergebnisse waren folgende:

NaF		L	$D^{40°}_{24h}$	Relative Aktivität
molare Konzentration	%	ccm		
0	0	0,8	1,11	100
$^m/_{1400}$	0,003	0,8	1,11	100
$^m/_{140}$	0,03	0,7	1,25	113
$^m/_{28}$	0,15	0,5	1,67	150
$^m/_{14}$	0,30	0,5	1,67	150
$^m/_{3.5}$	1,2	0,3	2,5	225
$^m/_{2}$	2,1	0,2	3,33	300
$^m/_{1.75}$	2,4	0,2	3,33	300

Das Aktivierungsvermögen ist also schon bei einem Gehalt der Lösung an 0,03 % des Fluornatriums wahrnehmbar und erreicht seinen höchsten Wert bei 2,1 %. Wahrscheinlich würde das Salz bei noch höherer Konzentration hemmen, diese Konzentration war aber wegen der Schwerlöslichkeit desselben nicht erreichbar.

Wirkung anderer anorganischer Verbindungen. Reines Chlornatrium übt nach Effront[2]) auf die Gerstenamylase keine Wirkung aus, dagegen wirkt das unreine Salz hemmend, es müssen also die Verunreinigungen einen schäd-

[1]) Bull. de la Soc. chim. Belg. 26, 27, 1912.

[2]) Effront-Bücheler, „Die Diastasen" S. 125.

lichen Einfluß haben. Daher benutzte ich ein reines, Merck-sches Präparat und erhielt folgende Resultate:

Konzentration des NaCl	L ccm	$D^{40^\circ}_{24\,h}$	Relative Aktivität
0	0,6	1,42	100
$^m/_{1000}$	0,6	1,42	100
$^m/_{100}$	0,8	1,1	77
$^m/_{10}$	0,8	1,1	77
$^m/_2$	$>1,0$	$<1,0$	<70
m	$>1,5$	$<0,63$	<44

Also auch das reine Chlornatrium hemmt, und es kann — auf Grund der Versuche mit Fluornatrium — hinzugefügt werden, daß für die schädliche Wirkung das Cl-Ion verantwortlich gemacht werden muß. Eben dieses Ion hat aber insbesondere nach den Versuchen Wohlgemuths[1]) auf die Amylase des Speichels eine stimulierende Wirkung. Nachdem nun dieser Unterschied im Verhalten der tierischen und pflanzlichen Amylasen schon öfter beobachtet wurde, halte ich denselben für charakteristisch.

Die Wichtigkeit des K-, Phosphat- und Nitrat-Ions im pflanzlichen Leben ist längst bewiesen; dieselben sind auch schon als Aktivatoren pflanzlicher Enzyme beobachtet worden. Unter den Bedingungen meiner Versuche konnte ich dies nicht finden:

Konzentration des Salzes		L ccm	$D^{40^\circ}_{24\,h}$	Relative Aktivität	Zeit des Versuches
K_2HPO_4	0	0,6	1,42	100	Dezember 1912
	$^m/_{1000}$	0,8	1,1	} 77	
	$^m/_{100}$	0,8	1,1		
	$^m/_{10}$	0,8	1,1		
	0	0,5	1,67	100	April 1913
	$^m/_{100\,000}$	0,45	2,0	} 120	
	$^m/_{10\,000}$	0,45	2,0		
	$^m/_{1000}$	0,45	2,0		
KH_2PO_4	0	0,6	1,42	100	Dezember 1912
	$^m/_{1000}$	0,7	1,25	88	
	$^m/_{100}$	0,9	1,00	70	
	$^m/_{10}$	1,5	0,63	44	
KNO_3	0	0,35	2,5	100	April 1913
	$^m/_{10\,000}$	0,35	2,5		
	$^m/_{1000}$	0,35	2.5		
	$^m/_{100}$	0,35	2,5		
	$^m/_{10}$	0,35	2,5		

[1]) Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 10, 1910.

Durch Säure wird die Wirkung vieler Enzyme, besonders auch der Amylasen, gesteigert; besonders klar tritt dies bei den Versuchen Maquenne und Roux'[1]) hervor, was diese Forscher dadurch erklären, daß die salzartig gebundene Amylopektinase durch die Säure freigemacht wird. In meinen Versuchen wirkte die Salzsäure nur in äußerst geringer Konzentration etwas stimulierend, höhere Konzentrationen hemmten stets. Um die etwa hydrolysierende Wirkung der Salzsäure zu erkennen, wurden eigens noch folgende Mischungen angesetzt:

1. 7 ccm H_2O + 1 ccm 3%iges NaF + 1 ccm 1%ige Stärkelösung + 1 ccm $^n/_{10}$-HCl.

2. Ebenso, jedoch statt der $^n/_{10}$-Säure n-HCl.

Beide Flüssigkeiten gaben zum Schluß des Versuches mit Jod eine intensiv schwarzblaue Färbung als Beweis dafür, daß die Säure unter diesen Bedingungen nicht hydrolysierte, demnach die viel geringere Konzentration derselben keine Wirkung ausüben konnte.

Die Resultate waren folgende:

<table>
<tr><th>Konzentration der HCl</th><th>L ccm</th><th>$D^{40°}_{24h}$</th><th>Relative Aktivität</th></tr>
<tr><td>0</td><td>0,5</td><td>1,67</td><td>100</td></tr>
<tr><td>$^m/_{10000}$</td><td>0,45</td><td>2,0</td><td>120</td></tr>
<tr><td>$^m/_{1000}$</td><td>0,6</td><td>1,42</td><td>85</td></tr>
<tr><td>$^m/_{100}$</td><td>$>$ 2,0</td><td rowspan="2">$<$ 0,5</td><td rowspan="2">$<$ 30</td></tr>
<tr><td>$^m/_{10}$</td><td>$>$ 2,0</td></tr>
</table>

Die Natronlauge wirkte in etwas größerer Konzentration stimulierend:

<table>
<tr><th>Konzentration der NaOH</th><th>L ccm</th><th>$D^{40°}_{24h}$</th><th>Relative Aktivität</th></tr>
<tr><td>0</td><td>0,5</td><td>1,67</td><td rowspan="2">100</td></tr>
<tr><td>$^m/_{10000}$</td><td>0,5</td><td>1,67</td></tr>
<tr><td>$^m/_{1000}$</td><td>0,45</td><td>2,0</td><td>120</td></tr>
<tr><td>$^m/_{100}$</td><td>1,5</td><td>0,63</td><td>38</td></tr>
<tr><td>$^m/_{10}$</td><td>$>$ 3,0</td><td>$<$ 0,33</td><td>$<$ 20</td></tr>
</table>

Aktivierung durch gekochten Kartoffelsaft. Die Enzymlösung wurde nach dem Aufkochen filtriert; die angesetzten Lösungen gaben folgende Ergebnisse:

---

[1]) Maquenne und Roux, Compt. rend. 142, 1059, 1906.

Gläs-chen	10 ccm Lösung enthielten ccm					Reaktion mit J
	Enzym	H_2O	Aufgekochte Enzymlösung	3 %iges NaF	1 %ige Stärke	
1.	0,4	5,6				schwachviolett
2.	0,6	5,4	2,0	1,0	1,0	braun
3.	0,7	5,3				gelb

Dabei war L ohne aufgekochten Saft bei 0,6 ccm, die relative Aktivität des mit aufgekochtem Saft aktivierten Enzyms war also etwa 150.

Hemmung durch verschiedene Zucker. Als Monosaccharide verwendete ich: Arabinose, Glucose, Mannose, Galaktose, Fructose; als Disaccharide: Maltose, Saccharose, Lactose. Die meisten wurden in dreierlei Konzentrationen angewendet, und zwar in zehntel-, halb- und ganzmolarer. Ausnahmen waren die Mannose und Lactose, die erstere zeigte schon in molarer Konzentration keine Wirkung, und daher war es überflüssig, andere Konzentrationen zu erproben. Die Lactose war dagegen unter den Bedingungen meiner Versuche wegen ihrer Schwerlöslichkeit in höherer als in halbmolarer Konzentration nicht anwendbar. Die Ergebnisse sind folgende:

Konzentration des Zuckers	L ccm	$D^{40°}_{24h}$	Relative Aktivität
	Arabinose.		
0	0,5	1,67	100
m/10	0,5	1,67	100
m/2	0,7	1,25	75
m	1,0	0,91	64
	Glucose.		
0	0,6	1,42	100
m/10	0,6	1,42	100
m/2	1,0	0,91	64
m	1,4	0,67	47
	Mannose.		
0	0,6	1,42	100
m	0,6	1,42	100
	Galaktose.		
0	0,6	1,42	100
m/10	0,6	1,42	100
m/2	0,7	1,25	88
m	0,8	1,1	77

Konzentration des Zuckers	L ccm	$D^{40°}_{24h}$	Relative Aktivität
		Fructose.	
0	0,5	1,67	100
m/10	0,5	1,67	100
m/2	0,8	1,1	66
m	1,0	0,91	64
		Maltose.	
0	0,6	1,42	100
m/10	0,8	1,1	77
m/2	1,2	0,77	54
m	1,5	0,63	44
		Saccharose.	
0	0,6	1,42	100
m/10	0,6	1,42	100
m/2	0,7	1,25	88
m	0,8	1,1	77
		Lactose.	
0	0,5	1,67	100
m/10	0,5	1,67	100
m/2	0,8	1,1	66

In dieser Zusammenstellung fällt die starke Wirkung der Maltose auf, die sich schon bei m/10-Konzentration bemerkbar macht, wobei nur 77 % von der Wirkung der Amylase verbleiben; bei m/2-Konzentration bleiben bloß mehr 54 % der ursprünglichen Aktivität wirksam, während dabei die Glucose nur bis auf 64 % hemmt u. s. w.

Am übersichtlichsten ist diese Wirkung der Zucker aus folgender Kurvenzeichnung zu ersehen:

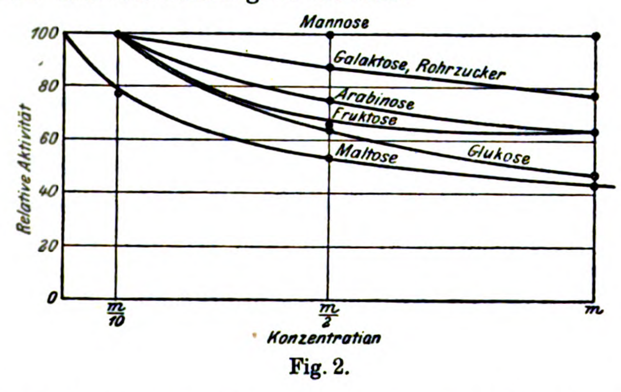


Fig. 2.

Zeitregel der Kartoffelamylase. Bei den hierzu nötigen Versuchen wurde die zur völligen Hydrolyse nötige

Enzymmenge zuerst auf 0,5 ccm ermittelt, um dann in einem zweiten Versuche bis auf 0,1 ccm bestimmt zu werden. Die Ergebnisse der Versuche waren folgende:

t (Zeit in Stunden): $^1/_2$, 1, 2, 4, 8 16, 32,
E (ccm Enzymlösung): 2,3, 1,8, 1,5, 1,0, 0,7, 0,5, 0,35.

Nimmt man als Einheit der Zeit $^1/_2$ Stunde und berechnet hierauf $E\sqrt{t}$, so wird dieses konstant sein, wie folgt:

t	E	$E\sqrt{t} = k$
1	2,3	$2{,}3\ \sqrt{1} = 2{,}30$
2	1,8	$1{,}8\ \sqrt{2} = 2{,}55$
4	1,5	$1{,}5\ \sqrt{4} = 3{,}00$
8	1,0	$1{,}0\ \sqrt{8} = 2{,}88$
16	0,7	$0{,}7\ \sqrt{16} = 2{,}80$
32	0,5	$0{,}5\ \sqrt{32} = 2{,}83$
64	0,35	$0{,}35\ \sqrt{64} = 2{,}80$

Die Werte von k schwanken etwas bei den zwei ersten Intervallen, und zwar in aufsteigender Richtung. Dies kann vielleicht auch durch die nicht ganz scharf zu bestimmende Färbung mit J verursacht sein. Bei den größeren Enzymmengen schied sich nämlich — wie schon anfangs erwähnt — ein Niederschlag aus, der eben bei diesen Versuchen kürzerer Dauer keine Zeit hatte, sich gehörig abzusetzen. Ich denke jedoch die größere Reaktionsgeschwindigkeit in diesen zwei Versuchen eher der verhältnismäßig größeren Menge des Enzyms zur Stärke zuschreiben zu können, wovon van Laer[1]) berichtet, daß es eine Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat, was dieser Forscher mit Adsorptionserscheinungen zu erklären sucht. Jedoch ist die Regelmäßigkeit der Werte von k im allgemeinen hinlänglich, um die Gültigkeit der Schützschen Regel bei der Kartoffelamylase zweifellos erscheinen zu lassen.

Die Verstärkung der Aktivität der Kartoffelamylase bei sterilem Aufbewahren: Der Kartoffelsaft wurde zu diesen Versuchen bei einer Temperatur von etwa 6 bis 10° im dunklen Keller bei Zusatz von 3 Vol.-% Toluol aufbewahrt

[1]) van Laer, Bull. de l'Acad. royal. Belg. **1911**, 310, 814 bis 817 und 821.

und seine Aktivität von Zeit zu Zeit bestimmt. Die Ergebnisse folgen:

Tag des Versuches	L ccm	$D^{40°}_{24h}$	Relative Aktivität	Dauer d. Aufbewahrens in Tagen	Tag der Herstellung der Enzymlösung
20. XII.	0,6	1,43	100	6	
23.	0,5	1,67	117	9	
26.	0,5	1,67	117	12	
27.	0,5	1,67	117	13	14. XII.
28.	0,5	1,67	117	14	
30.	0,6	1,43	100	16	
1. I.	0,6	1,43	100	18	
4.	0,6	1,43	100	21	
5. I.	0,6	1,43	100	1	
7.	0,5	1,67	117	3	
11.	0,4	2,0	140	7	4. I.
12.	0,35	2,5	175	8	
13.	0,4	2,0	140	9	

Das Schwanken der Aktivität ist bei der ersten Lösung schwächer als bei der zweiten, obzwar beide Lösungen von derselben Kartoffelsorte der nämlichen Abstammung waren. Diese Versuche bestätigten also in exakter Weise die beiläufigen Beobachtungen Baranetzkys, nur besteht dabei natürlich noch immer der Unterschied, daß Baranetzky mit seiner wenig empfindlichen Methodik die ursprüngliche Aktivität des Kartoffelsaftes nicht zu erkennen vermochte.

Die Dissoziationskonstante der Kohlensäure.

Von

L. Michaelis und P. Rona.

(Eingegangen am 2. Juli 1914.)

Es gibt wohl keine Dissoziationskonstante, deren genaue Kenntnis von so großer Tragweite für die gesamte Biologie ist wie die der Kohlensäure. Wir können hier nur auf die Arbeiten von L. J. Henderson kurz hinweisen, der die so überaus zweckmäßige Eigenschaft der Kohlensäure zur Aufrechterhaltung der Neutralität erkannt hat. Wir empfanden es nun im Laufe unserer Untersuchungen der letzten Jahre als einen Übelstand, daß in neuerer Zeit keine Nachprüfungen dieser Dissoziationskonstanten gemacht worden sind. Zwar ist die zweite Dissoziationskonstante der Kohlensäure vor einiger Zeit durch Auerbach und Pick[1]) sehr sorgfältig bestimmt worden, für die erste Konstante fehlen derartige Untersuchungen aus neuester Zeit aber noch.

Diese wurde zuerst von Walker und Cormack[2]) berechnet, und zwar auf Grund von Leitfähigkeitsmessungen reiner Kohlensäurelösungen. Aus Versuchen von Knox[3]) berechneten sie dieselbe $= 3{,}7$ bis $3{,}8 \cdot 10^{-7}$, auf Grund ihrer eigenen Versuche $= 3{,}04 \cdot 10^{-7}$, aus einer zweiten Versuchsreihe $3{,}08 \cdot 10^{-7}$; erstere aus Leitfähigkeitsmessungen an Lösungen aus fester CO_2, letztere aus CO_2 aus Marmor.

Wir haben nun vor kurzem eine elektrometrische Methode

---

[1]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 38, 243, 1911.

[2]) Journ. of the Chem. Soc. 77, 5, 1900.

[3]) Annal. d. Physik u. Chem. 54, 44, 1895.

zur Bestimmung von Säuredissoziationskonstanten beschrieben[1]) und wollen diese jetzt zur Bestimmung der physiologisch so ganz besonders bedeutsamen Dissoziationskonstante der Kohlensäure anwenden.

Die Methode besteht darin, daß wir die $[H^{\cdot}]$ in einem bekannten Gemisch der Säure mit ihrem Natronsalz messen. Der einzige Umstand, der hier manchmal eine gewisse Willkürlichkeit mit sich bringt, ist, daß wir meist den elektrolytischen Dissoziationsgrad des Natriumsalzes, δ, nur ungefähr abschätzen können. Die Größe dieser Zahl tritt bei der Berechnung an Bedeutung um so mehr zurück, je größer der Überschuß der freien Säure über das Natriumsalz ist. Diese Bedingung konnten wir in der früheren Arbeit experimentell leicht erfüllen. Bei der Kohlensäure ist es aber wegen der Flüchtigkeit der freien Säure nicht ratsam, sie in großem Überschuß anzuwenden, weil die Reproduzierbarkeit der Lösung und die elektrometrische Messung darunter leidet und so die Fehler größer statt kleiner werden. Trotzdem erfüllt die Methode ihre Aufgabe befriedigend, wenn wir auch nur mit sehr niederen CO_2-Konzentrationen arbeiten können.

Wenn wir nämlich die Konzentration des $NaHCO_3$ sehr klein wählen, können wir dessen Dissoziationsgrad beinahe $= 1$ setzen oder vielmehr ihn so genau abschätzen, daß die Fehler dieser Abschätzung im höchsten Fall wenige Prozente betragen können. Unsere erste Aufgabe bestand daher darin, in einer sehr schwachen $NaHCO_3$-Lösung, die etwas freie CO_2 enthielt, die $[H^{\cdot}]$ zu messen. Wir stellten diese Lösung durch passende Vermischung von Soda, Salzsäure und CO_2-freiem Wasser her. Die Messungen geschahen nach der von Michaelis und Davidoff beschriebenen, für CO_2-haltige Flüssigkeiten anwendbaren Methode. Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich bei L. Michaelis[2]). Der Fehler, der durch das Entweichen von CO_2 in den Gasraum der Elektrode entsteht, ist hier sehr klein und außerdem gut berechenbar. Er besteht erstens darin, daß die Flüssigkeit durch Entweichen von CO_2 alkalischer wird; zweitens darin, daß der Partialdruck des Wasserstoffs durch

[1]) Diese Zeitschr. 49, 232, 1912.

[2]) L. Michaelis, Die Wasserstoffkonzentration. Berlin 1914, Julius Springer. S. 144.

Beimengung des CO_2 geringer und das Potential zu klein wird. Diese beiden Fehler sind von entgegengesetzten Vorzeichen und sind bei der Verwertung unserer Messungen berücksichtigt worden. Die Reproduzierbarkeit der nach unserer Methode erhaltenen Werte ist vielleicht nicht ganz so gut, wie bei der Messung CO_2-freier Flüssigkeiten, wo die EMK in der Regel innerhalb eines Millivolts reproduzierbar ist; die Grenzen der Reproduzierbarkeit sind hier in der Regel auf 2 Millivolt zu veranschlagen. Das rührt offenbar davon her, daß eine gegen atmosphärische Luft doch immerhin übersättigte CO_2-Lösung an sich nicht so gut definiert ist wie eine CO_2-freie Lösung. Jedenfalls wird man aus den mitgeteilten Zahlen wohl wiederum die Überzeugung gewinnen, daß unsere höchst einfache Methode der Hasselbalchschen an Genauigkeit nicht nachsteht. Das wichtigste ist, bis zur Einfüllung der Flüssigkeit in die Elektroden jeden Kohlensäureverlust zu vermeiden. Bei dem sehr geringen Gehalt an CO_2 unserer Lösungen ist das aber leicht zu erreichen.

Erste Versuchsreihe.

Es wurde folgende Mischung untersucht: 3,75 ccm n-HCl wurden in einem 500 ccm fassenden Meßkolben mit etwas weniger als 500 ccm destilliertem Wasser verdünnt, das vorher in einem verzinnten Kupfergefäß aufgekocht und luftdicht verschlossen abgekühlt worden war. Dazu wurden 5 ccm n (= $^m/_2$) Na_2CO_3-Lösung und Wasser auf 500 gegeben.

Die Lösung enthält pro Liter
0,0025 Mole CO_2, 0,0025 Mole $NaHCO_3$, 0,0075 Mole NaCl.

Die Lösung gab gegen eine gesättigte Kalomelelektrode, die gegen das Standardacetatgemisch einen über viele Monate kontrollierten konstanten Wert von 517,4 Millivolt $\pm <$ 0,5 Millivolt bei 18° zeigte, folgende Potentialdifferenz. (Über die genaue Berücksichtigung der Temperatur bei der Berechnung siehe L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, 1914, S. 157.)

Lösung Nr.	Temperatur	EMK	Mittel	p_H
I	22,5°	616,2 618,3 618,2 616,8	617,4	6,318

Lösung Nr.	Temperatur	EMK	Mittel	p_H
II	20°	618,1 617,8	617,9	6,353
III	22°	616,8 619,5 617,2	617,5	6,325
IV	22°	616,5 617,0 616,5	616,7	6,311

$$\text{Mittel} \quad p_H = 6{,}327$$
$$[H^{\cdot}] = 4{,}7 \cdot 10^{-7}.$$

Hier können wir zunächst eine methodische Korrektur anbringen. Da unsere Methode es mit sich bringt, daß ein wenig CO_2 aus der Flüssigkeit in den Gasraum der Elektrode entweicht, und da dieser Gasraum in unserer Elektrode etwa $^1/_{10}$ Volumen der Flüssigkeit einnimmt, und da ferner der Teilungskoeffizient der CO_2 zwischen Wasser und Gasraum etwa 1 ist, so müssen wir die $[H^{\cdot}]$ um etwa $10\,^0/_0$ höher ansetzen, als wir sie messen, und es ist

$$[H^{\cdot}] = 5{,}17 \cdot 10^{-7}.$$

Ferner müssen wir berücksichtigen, daß der Partialdruck des Wasserstoffgases durch die Aufnahme von etwas CO_2 herabgesetzt wird. Dadurch fällt die EMK der Kette etwas zu klein aus, und zwar um den Betrag $\varepsilon = \frac{0{,}0001983}{2} \cdot T \cdot \log p$, wenn p den Partialdruck des Wasserstoffgases in Atmosphären bedeutet. Unsere Lösung enthält 0,0025 Mol CO_2 pro Liter, also nach Abgabe von CO_2 an den Wasserstoffraum 0,00225 Mole CO_2 pro Liter, d. i. 0,01 Gewichtprozente CO_2. Diese entsprechen 5 Volumenprozenten CO_2 von Atmosphärendruck. Da der Teilungskoeffizient von CO_2 zwischen Wasser und einem Gasraum bei Zimmertemperatur nahezu 1:1 ist, so enthält auch das Wasserstoffgas der Elektrode 5 Volumenprozente CO_2, und das H_2-Gas hat einen Partialdruck von 0,95 Atmosphären. Die Korrektur ε beträgt daher

$$-\frac{0{,}0001983}{2} \cdot 293 \cdot \log 0{,}95 = 0{,}0006 \text{ Volt}.$$

Wollen wir diese kleine Korrektur noch berücksichtigen, so müßten diese 0,6 Millivolt zu der gemessenen Millivoltzahl zugezogen werden, wodurch sich p_H um 0,010 vergrößert, bzw. [H˙] um 3% verkleinert würde. So ergäbe sich statt [H˙] = 5,17 · 10^{-7}

$$[H^{\cdot}]_{korr} = 5{,}02 \cdot 10^{-7}.$$

Wenn wir den elektrolytischen Dissoziationsgrad, δ, des Natriumbicarbonat schätzen wollen, so legen wir zunächst die Werte von Walker und Cormack für die Leitfähigkeit von $NaHCO_3$-Lösungen zugrunde:

Bei 18° Konzentration	Molekulare Leitfähigkeit	Daraus berechneter Dissoziationsgrad γ
0,03125 n	65,6	0,826
0,01562 n	68,6	0,863
0,00781	71,1	0,895
0,0039 n	73,9	0,931
0,00195 n	76,0	0,955
$\frac{1}{\infty}$ (extrapol.)	79,5	

In unseren Lösungen ist der Gehalt an $NaHCO_3$ 0,0025 n. Der gesamte Na-Gehalt ist = 0,01 n. Für derartige Lösungen ist also δ zwischen etwa 0,863 und 0,895 anzusetzen. Es dürfte als ein jedenfalls nicht zu gröberen Fehlern führender Wert $\delta = 0{,}88$ gesetzt werden. Es ist sicher anzunehmen, daß wir mit dieser Annahme keinen Fehler machen, der die berechnete Dissoziationskonstante um ± 5% ihres Wertes fälschen könnte.

Berechnen wir nun die Dissoziationskonstante der Kohlensäure nach der Formel

$$k = [H^{\cdot}] \cdot \delta \cdot \frac{[\text{Na-Bicarbonat}]}{[CO_2]},$$

so ist

$$k = 4{,}40 \cdot 10^{-7}$$

(statt des bisher gebräuchlichen Wertes 3,04 · 10^{-7}).

Der Wert weicht also recht merklich von dem von Walker und Cormack ab; unser Wert ist um fast die Hälfte größer;

auch gegenüber dem von Walker und Cormack aus den Versuchen von Knox berechneten Wert ist er noch um 20% größer. Worauf die Unterschiede beruhen, ist nicht leicht zu sagen. Jedoch möchten wir die Vorteile unserer elektrometrischen Methode gegenüber der Leitfähigkeitsmethode dieser Autoren nochmals hervorheben:

1. Unsere Methode stellt bedeutend geringere Ansprüche an die Reinheit des Wassers.

2. Die Leitfähigkeitsmethode basiert auf der genauen Kenntnis der Grenzleitfähigkeit des Natriumbicarbonats, woraus die absolute Leitfähigkeit des HCO_3'-Ions berechnet werden muß. Dies ist nur durch eine Extrapolation möglich. Für unsere Methode spielt diese Größe nur eine untergeordnete Rolle, insofern, als durch eine ungenaue Kenntnis dieser Grenzleitfähigkeit der Dissoziationsgrad des $NaHCO_3$ um einige Prozente falsch veranschlagt werden kann.

Man könnte allerdings auch noch daran denken, daß in den salzfreien Lösungen von reiner CO_2, die die anderen Autoren anwendeten, die Dissoziationskonstante der CO_2 ein wenig kleiner war als in unseren salzhaltigen Lösungen, da Arrhenius ein Anwachsen der Dissoziationskonstante schwacher Säuren mit dem Elektrolytgehalt der Lösung nachgewiesen hat. Wir glauben allerdings nicht, daß dies den ganzen Unterschied der Befunde zu erklären vermag.

Dieselbe Lösung wurde nun bei höherer Temperatur untersucht. Die Lösung wurde kalt hergestellt, in die Elektroden eine Wasserstoffblase eingeleitet, und zwar in Anbetracht der bei der Erwärmung später eintretenden Ausdehnung etwas weniger als sonst, der Stopfen aufgesetzt, im Wasserbad annähernd auf die Temperatur des Luftthermostaten vorgewärmt, 100 mal umgekippt und dann im Luftthermostaten gemessen. Als Ableitungselektrode wurde in diesem Fall die Standacetat-Wasserstoffelektrode benutzt. Die Temperatur des Thermostaten wurde in der Weise festgestellt, daß ein mit Wasser gefülltes Elektrodenrohr mit einem Thermometer versehen und neben die Versuchselektroden in den Luftthermostaten gestellt wurde. Die Temperatur und das Potential erwiesen sich etwa nach 1 bis 2 Stunden als konstant. Es ergab sich:

Temperatur	Millivolt	Mittel	[H˙]
36,0°	103,0		
	102,5	102,9	$4{,}8 \cdot 10^{-7}$
	103,3		

Die [H˙] $4{,}8 \cdot 10^{-7}$ ist innerhalb der Fehlerquellen gleich der bei Zimmertemperatur erhaltenen, $4{,}7 \cdot 10^{-7}$. Das bestätigt also unsere frühere Angabe[1]), daß der Temperaturkoeffizient der Konstante der Kohlensäure zwischen 18° und 38° praktisch = 0 ist. Wir führen zum Beweis hierfür noch folgende Versuche an, die wir aus mehreren Gründen nicht zur Berechnung des absoluten Wertes der Konstanten verwenden wollen, aber doch für den Temperaturkoeffizienten gut brauchbar sind. Es ergibt sich aus ihnen dasselbe Resultat. Wir sehen hier wiederum wie in unserer früheren Arbeit, daß ein sicher festzustellender Temperaturkoeffizient zwischen 18° und 38° nicht besteht. Der Grund, warum wir diese Zahlen zur Berechnung der Konstanten nicht mitbenutzen wollen, liegt in ihrer unzweckmäßigen Zusammensetzung. Das Verhältnis $CO_2 : NaHCO_3$ beträgt hier 1 : 9, und der allergeringste Titerfehler der Soda- und Salzsäurelösung, aus der sie bereitet wurden, hätte eine bedeutende Änderung dieses Verhältnisses zur Folge. Außerdem sind die Lösungen zu reich an $NaHCO_3$ und an NaCl, um eine sichere Angabe über den Dissoziationsgrad des Bicarbonats zu gestatten. Da aber die zur Messung in der Wärme und in der Kälte benutzten Flüssigkeiten stets ein und derselben Mischung entstammten, so eignen sich die zahlreichen Messungen wenigstens zur Beurteilung des Temperaturkoeffizienten der Konstanten. Im übrigen weicht auch die aus diesen Zahlen berechnete Dissoziationskonstante kaum von der oben erhaltenen ab; es soll jedoch hierauf kein Gewicht gelegt werden.

A. 10,0 ccm norm. ($^1/_2$ molare) Sodalösung,
5,5 ccm norm. HCl,
84,5 ccm reinstes Wasser.

B. 10,0 ccm norm. Sodalösung,
5,5 ccm " HCl,
10,0 ccm " NaCl,
174,5 ccm Wasser.

[1]) L. Michaelis und Davidoff, diese Zeitschr. 46, 131, 1912.

Es wurden gefunden:

Flüssigkeit A Temperaturen	p_H	Flüssigkeit B Temperaturen	p_H
16	7,230	16,2	7,170
16	7,241	16,2	7,154
15	7,172	15,0	7,102
15	7,190	15,0	7,186
15,5	7,200	15,5	7,163
15,5	7,233	15,5	7,140
18,0	7,244	17,5	7,228
18,0	7,158	17,5	7,143
18,0	7,175	Mittel **16,3°**	**7,161**
18,0	7,175		$[H^\cdot] = 6{,}90 \cdot 10^{-8}$
Mittel **16,5°**	**7,202**		
	$[H^\cdot] = 6{,}29 \cdot 10^{-8}$		

Flüssigkeit A Temperaturen	p_H	Flüssigkeit B Temperaturen	p_H
36,5	7,173	37,0	7,136
37,0	7,248	37,0	7,143
37,0	7,225	37,2	7,183
37,2	7,214	37,2	7,152
Mittel **37,0°**	**7,215**	37,0	7,168
	$[H^\cdot] = 6{,}10 \cdot 10^{-8}$	37,0	7,222
		37,0	7,202
		37,0	7,202
		Mittel **37,0°**	**7,176**
			$[H^\cdot] = 6{,}67 \cdot 10^{-8}$

Aus dem äußerst geringen Temperaturkoeffizienten würde folgen, daß Dissoziationswärme der Reaktion

$$CO_2 \rightleftarrows HCO_3' + H^\cdot$$

oder die Ionisationswärme der Kohlensäure äußerst gering ist. Sie wurde von Thomsen = — 2800 cal angegeben, ein Wert, der zwar klein, aber im Vergleich zu unseren Befunden noch nicht klein genug ist. Dieser Wert würde nämlich für den Temperaturkoeffizienten verlangen nach der van't Hoffschen Formel

$$\frac{d \ln k}{dT} = -\frac{U}{RT^2}$$

oder für $T =$ etwa 300

$$\frac{d \log^{10} k}{dT} = \frac{2800}{4{,}571 \cdot 300^2} = 0{,}0068,$$

also

$$\log k_{38^\circ} = \log k_{18^\circ} + 20 \cdot 0{,}0068$$

oder

$$\log k_{38^\circ} - \log k_{18^\circ} = 0{,}136$$

oder

$$\frac{K_{38^\circ}}{K_{18^\circ}} = 1{,}37\,.$$

Die Konstante müßte also bei 38° um 37% von der bei 18° verschieden sein; dieser Unterschied ist zwar klein, würde uns aber nicht entgangen sein. Es wäre daher erwünscht, die Dissoziationswärme der Kohlensäure neu zu bestimmen. Im übrigen ist die hier gemeinte Wärmetönung natürlich nicht die der Reaktion

$$H_2CO_3 \longrightarrow H^{\cdot} + HCO_3{}',$$

sondern die der Reaktion

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H^{\cdot} + HCO_3{}',$$

wie ja überhaupt unsere Dissoziationskonstante nicht die wahre Konstante $\frac{[H^{\cdot}]\,.\,[HCO_3{}']}{[H_2CO_3]}$ ist[1]), sondern die „scheinbare" Dissoziationskonstante $\frac{[H^{\cdot}]\,[HCO_3{}']}{[CO_2]}$.

Zweite Versuchsreihe.

Ähnliche Versuche wurden mit etwas höherem Gehalt an CO_2 und $NaHCO_3$ angestellt.

I. $^m/_2$-Soda 10 ccm, n-HCl 7,5 ccm, Wasser auf 200,

d. h. pro Liter

0,0125 Mole CO_2, 0,0125 Mole $NaHCO_3$, 0,0375 Mole NaCl.

Temperatur	EMK		p_H	H˙]
19°	618,0			
	619,0			
	619,0	619,0	6,38	$4{,}17 \cdot 10^{-7}$
	620,3			
	618,5			

Die Tabellen stimmen mit den vorangehenden fast innerhalb der Versuchsfehler überein. Wir verzichten darauf, sie zur Berechnung der Konstanten zu benutzen.

---

[1]) Diese wurde neuerdings von A. Thiel zu angenähert $5 \cdot 10^{-4}$ bestimmt. (Ber. 47, 945, 1914.)

II. ccm n-Soda | n-HCl | Volumen
5 | 3,75 | 500 + 4,25 g NaCl

d. h. wie die Lösungen der ersten Versuchsreihe, + NaCl

		Mittel		
20°	610,1 610,2 610,2	610,1	6,22	$6,0 \cdot 10^{-7}$
24°	606,8 607,0 607,0	607,0	6,13	$7,4 \cdot 10^{-7}$
22°	609,3 609,0	609,2	6,18	$6,6 \cdot 10^{-7}$
22°	608,0 609,0	608,5	6,17	$6,8 \cdot 10^{-7}$
			Mittel	$6,8 \cdot 10^{-7}$

Wir korrigieren diese Zahl wieder, indem wir 10% wegen des Kohlensäureverlustes der Flüssigkeit abziehen und 3% wegen Verringerung des Partialdruckes des Wasserstoffs zuziehen; so ist

$$[H^\cdot] = 7,28 \cdot 10^{-7}.$$

III.

ccm n-Soda	n-HCl	Volumen	NaCl	Temperatur
5	3,75	500	17,5 g	24°

22°	599,0 600,0 602,0	600,3	$9,1 \cdot 10^{-7}$
21°	599,6 599,7 599,2	599,3	$9,5 \cdot 10^{-7}$
Mittel 21,8°			$9,3 \cdot 10^{-7}$
		korrigiert	$9,95 \cdot 10^{-7}$

Nehmen wir die aus der ersten Versuchsreihe berechnete Dissoziationskonstante als die richtige an, und nehmen wir ferner an, daß diese sich durch den höheren Gehalt der Lösungen an Elektrolyten nicht meßbar ändert, so können wir diese Versuche dazu benutzen, um den elektrolytischen Dissoziationsgrad des $NaHCO_3$ in unseren verschiedenen Lösungen zu berechnen. Da nämlich

$$[H^\cdot] = \frac{k \cdot [CO_2]}{\delta \cdot [NaHCO_3]},$$

so ist

$$\delta = \frac{k}{[H^{\cdot}]} \cdot \frac{[CO_2]}{[NaHCO_3]}.$$

Auf diesem Wege finden wir aus der dritten Versuchsreihe in Lösung

I $\delta = 0{,}605$

II $\delta = 0{,}445$

Die Lösung I entspricht etwa dem Na-Gehalt des Blutserums, II etwa dem des Meerwassers.

Wir müssen also den Dissoziationsgrad des Natriumbicarbonats im Blut $= 0{,}6$ annehmen und nicht, wie bis jetzt üblich, $= 0{,}8$. Es ist sehr wohl möglich, daß der Dissoziationsgrad einer reinen $NaHCO_3$-Lösung von dem Na-Gehalt des Blutes einen höheren Dissoziationsgrad hat, und daß der Dissoziationsgrad des $NaHCO_3$ im Blut durch den Überschuß an NaCl ein wenig herabgedrückt wird. Im Meerwasser ist das $NaHCO_3$ kaum zur Hälfte elektrolytisch dissoziiert.

Bei der Berechnung der Verteilung der Kohlensäure im Blut empfehlen wir daher, die neu bestimmten Zahlen für k und δ zu benutzen; auf den Einfluß dieser Zahlen auf die physiologischen Anschauungen werden wir später zurückkommen.

Zusammenfassung.

Die Dissoziationskonstante der Kohlensäure beträgt, in weitem Maße unabhängig von der Temperatur, $4{,}4 \cdot 10^{-7}$. Der Dissoziationsgrad des Natriumbicarbonats im Blut beträgt nur 0,6.

Die Dissoziationskonstante der β-Oxybuttersäure.

Von

L. Michaelis und T. Garbendia.

(Eingegangen am 2. Juli 1914.)

Die Säuredissoziationskonstante der β-Oxybuttersäure ist von L. J. Hendersen gleich $2 \cdot 10^{-5}$ bestimmt worden, und zwar mit Hilfe eines colorimetrischen Verfahrens, das von H. Friedenthal für diesen Zweck angegeben wurde. Da wegen des oft unberechenbaren Salzfehlers der Indicatoren diese Methode nur als eine angenäherte angesehen werden kann, so unternahmen wir es, mit Hilfe der von uns angegebenen elektrometrischen Methode die Bestimmung dieser wichtigen Konstanten neu auszuführen. Das Ausgangsmaterial stellte ein von Herrn Prof. Magnus-Levy zuerst dargestelltes[1]) und von ihm uns freundlichst überlassenes schön krystallisiertes Natriumsalz der Säure dar. Es enthält kein Krystallwasser und wurde vor der Benutzung über eine Woche über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet.

Die erste Gruppe von Versuchsreihen bestand in der Messung der $[H^{\cdot}]$, einer Lösung dieses Salzes nach Zusatz etwa des halben Äquivalents HCl, und zwar in hoher Verdünnung.

Versuchsreihe 1.

0,1282 g β-oxybuttersaures Natron + 5 ccm n-HCl, auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt.

Die Lösung ist an

Oxybuttersäure	0,0100 n
oxybuttersaurem Natrium . .	0,01036 n
NaCl	0,0100 n

[1]) Magnus-Levy, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 45, 392.

Potentialdifferenz gegen eine gesättigte Kalomelelektrode, die gegen Standardacetatgemisch bei 18° 517,4 Millivolt zeigt:

Versuch a	b	c	Temperatur
503,5	503,5	503,0	21°

Mittel: 503,3
$p_H = 4,375$
$[H^{\cdot}] = 4,21 \cdot 10^{-5}$.

Versuchsreihe 2.

0,1280 g β-oxybuttersaures Natrium, 5 ccm 0,1 n-HCl, Wasser auf 50 ccm; d. h.

Oxybuttersäure . . . . . . 0,0100 n
oxybuttersaures Natrium . . 0,01032 n
NaCl . . . . 0,0100 n

Versuch a	b	Temperatur
505,0	504,0	22°

Mittel: 504,5
$p_H = 4,393$
$[H^{\cdot}] = 4,04 \cdot 10^{-5}$.

Versuchsreihe 3.

0,124 g β-oxybuttersaures Natron, 5 ccm 0,1 n-HCl, Wasser auf 50 ccm; d. h.

Oxybuttersäure . . . . . . 0,0100 n
oxybuttersaures Natrium . . 0,00928 n
NaCl . . . . 0,0100 n

Versuch a	b	c	d	e	Temperatur
500,7	501,0	501,0	500,6	500,0	22°

Mittel: 500,7
$p_H = 4,328$
$[H^{\cdot}] = 4,70 \cdot 10^{-5}$.

Versuchsreihe 4.

0,1527 g oxybuttersaures Natron, 5 ccm 0,1 n-HCl, Wasser auf 50 ccm; d. h.

Oxybuttersäure . . . . . . 0,0100 n
oxybuttersaures Natrium . . 0,01424 n
NaCl . . . . 0,0100 n

Versuch a	b	c	Temperatur
513,0	513,1	513,2	22°

Mittel: 513,1

$$p_H = 4{,}540$$
$$[H^{\cdot}] = 2{,}89 \cdot 10^{-5}.$$

Versuchsreihe 5.

0,1731 g β-oxybuttersaures Natron, 5 ccm 0,1 n-HCl, Wasser auf 50 ccm; d. h.

Oxybuttersäure . . . . . . 0,0100 n
oxybuttersaures Natrium . . 0,01748 n
NaCl . . . . 0,0100 n

Versuch a	b	c	Temperatur
516,9	517,0	517,0	22°

$$p_H = 4{,}607$$
$$[H^{\cdot}] = 2{,}47 \cdot 10^{-5}.$$

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante k benutzen wir die Formel

$$k = [H^{\cdot}] \cdot \delta \cdot \frac{[\beta\text{-oxybuttersaures Natrium}]}{[\text{freie } \beta\text{-Oxybuttersäure}]}.$$

δ ist der Dissoziationsgrad des β-oxybuttersauren Natriums; derselbe hängt von dem Gesamt-Na-Gehalt der Lösung ab. Dieser ist 0,02 n, und wir dürfen den Dissoziationsgrad in dieser Konzentration 0,90 ansetzen und können sicher sein, damit keinen ins Gewicht fallenden Fehler zu begehen. Alsdann ergibt sich

aus Versuchsreihe	1	2	3	4	5
$k \cdot 10^5 =$	3,93	3,71	4,09	3,82	3,89

Da wir zu der Annahme Grund zu haben glauben, daß das Salz in der Versuchsreihe 3 ein Spürchen Feuchtigkeit enthielt (wodurch die Konstante scheinbar vergrößert wird), so wollen wir bei der Berechnung des Mittels diesen Wert nur mit halber Bedeutung einrechnen, und es ergibt sich als Mittel

$$k = 3{,}86 \cdot 10^{-5}.$$

Nach Abschätzung aller Fehlerquellen des Experiments und der Rechnung halten wir die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Wert mehr als 5% von der Wahrheit sich entfernt, für sehr gering.

Bekanntlich ist die genaue Kenntnis dieser Konstanten notwendig, um zu berechnen, wieviel β-Oxybuttersäure in einer

Körperflüssigkeit frei, wieviel als Salz vorhanden ist. Hierfür bedarf es aber auch noch der Kenntnis des Dissoziationsgrades des β-oxybuttersauren Natriums in den Körperflüssigkeiten. Derselbe wird hauptsächlich bestimmt durch die Menge des anwesenden Gesamt-Na + K. Zweiwertige Metallionen würden ihn noch stärker herabdrücken, jedoch sind diese in den Körperflüssigkeiten in so geringer Konzentration vorhanden, daß wir sie nicht zu berücksichtigen brauchen.

Wir untersuchten deshalb dieselben Lösungen, indem wir einen Teil derselben mit 0,85 % festem NaCl versetzten. Es ergab sich (die Numerierung entspricht der Parallelreihe der vorangehenden Versuche).

Versuchsreihe 2.

Versuch a	b	c	Temperatur
497,5	498,0	497,5	33°

Mittel: 497,7

$p_H = 4{,}277$

$[H^{\cdot}] = 5{,}29 \cdot 10^{-5}$.

Versuchsreihe 4.

Versuch a	b	c	Temperatur
507,3	507,0	507,2	22°

Mittel: 507,2

$p_H = 4{,}439$

$[H^{\cdot}] = 3{,}64 \cdot 10^{-5}$.

Wenden wir die Formel an

$$\delta = \frac{k}{[H^{\cdot}]} \cdot \frac{[\text{freie Oxybuttersäure}]}{[\text{oxybuttersaures Natrium}]}$$

und benutzen für k den oben ermittelten Wert, so ergibt sich:

Versuchsreihe	2	4
$\delta =$	0,71	0,74

Mittel: $\delta = 0{,}725$.

Für eine Flüssigkeit, deren NaCl-Gehalt gleich 0,85 % ist, ist also der Dissoziationsgrad des β-oxybuttersauren Natriums gleich 0,72 zu veranschlagen.

Schließlich wurde auch noch der Dissoziationsgrad des β-oxybuttersauren Natrons in einer 2 %igen NaCl-Lösung untersucht, die etwa dem Harn entspricht.

Versuchsreihe 5.

Versuch a	b	c	Temperatur
509,0	508,0	508,5	22°

Mittel: 508,5

$$p_H = 4{,}462$$
$$[H^{\cdot}] = 3{,}46 \cdot 10^{-5}$$
$$\delta = 0{,}64.$$

Das Resultat ist also:

Die Dissoziationskonstante der β-Oxybuttersäure bei 22° ist

$$k = 3{,}86 \cdot 10^{-5}.$$

Der Dissoziationsgrad δ ihres Natronsalzes in einer Flüssigkeit mit einem Gehalt von 0,85 % NaCl ist $\delta = 0{,}72$,
„ „ „ „ 2 % „ „ $\delta = 0{,}64$.

Zur Berechnung der freien β-Oxybuttersäure im Blut oder Harn kann nunmehr die von mir gegebene Formel[1]) ohne weiteres

$$\varrho' = \frac{\delta \cdot \varrho}{1 - \varrho(1 - \delta)}$$

angewendet werden; hier ist ϱ' das Verhältnis der freien Oxybuttersäure zur Gesamtmenge derselben; und

$$\varrho = \frac{[H^{\cdot}]}{[H^{\cdot}] + k}.$$

Z. B. wäre in einem Harn, dessen $[H^{\cdot}] = 1 \cdot 10^{-5}$ beträgt und dessen NaCl-Gehalt ungefähr 2 % ist

$$\varrho' = 0{,}143,$$

d. h. 14,3 % der Oxybuttersäure sind frei.

Ohne Berücksichtigung des Dissoziationsgrades würde sich ergeben

$$\varrho = 0{,}26,$$

d. h. 26 % freie Säure, und nimmt man gar den Wert der Dissoziationskonstanten, den Henderson seinen Rechnungen zugrunde legt, so wäre

$$\varrho = 0{,}33,$$

d. h. 33 % der Säure wären frei.

Wie man sieht, haben die von uns angebrachten Korrekturen einen recht merklichen Einfluß auf das Resultat.

[1]) L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 26.

Der isoelektrische Punkt des Kohlenoxydhämoglobins und des reduzierten Hämoglobins.

Von

L. Michaelis und Z. Bien.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 3. Juli 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Der isoelektrische Punkt des Kohlenoxydhämoglobins.

In einer früheren Arbeit[1]) wurde der isoelektrische Punkt des Hämoglobins, und zwar zunächst in der Form des Oxyhämoglobins bestimmt. Mit Hilfe der uns angegebenen Methode läßt er sich mit großer Genauigkeit bestimmen. Es ergab sich für Oxyhämoglobin $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ und es zeigte sich, daß das Resultat gleich war, ob wir mit Lösungen von krystallisiertem Oxyhämoglobin, oder mit lackfarben gemachtem Blut, oder mit gewaschenen, lackfarben gemachten Blutkörperchen, oder mit absichtlich mit Albumin verunreinigten Hämoglobinlösungen arbeiteten, ferner gleichgültig, ob wir als Regulator Phosphatgemische oder Kakodylsäure in bis zu einem gewissen Grade wechselnden Konzentration benutzten.

Wir legen uns nun die Frage vor, wie andere Modifikationen des Hämoglobins sich verhalten. Wir beginnen heute mit dem CO-Hämoglobin.

Dieses wurde folgendermaßen bereitet: Blut wird zentrifugiert, mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit Regulatorgemisch verdünnt und dadurch gleichzeitig lackfarben gemacht, und, falls trübe, filtriert, sodann Leuchtgas ca. 15 Min. durchgeleitet. Die Technik der Überführung wie sonst.

[1]) L. Michaelis und H. Davidsohn: Über die Kataphorese des Oxyhämoglobins. Diese Zeitschr. **41**, 102, 1912.

Bei den meisten Versuchen wird die [H˙] der Mittel- und Seitenflüssigkeit vor dem Stromdurchgang, sowie die der Mittel- und der beiden Seitenflüssigkeiten nach dem Stromdurchgang elektrometrisch gemessen. Die angegebene Zahl der [H˙] entspricht dem Mittelwert[1]). Alle Versuche ergaben übrigens, daß sich die Mittel- und Seitenflüssigkeiten, vor und nach dem Stromdurchgang, niemals mehr als 3 bis 4 Millivolt unterscheiden, deshalb hielten wir uns für berechtigt, statt der einzelnen Messungen den Mittelwert anzugeben.

Die Versuche sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben, aus der sich ein Stillstand bei einer [H˙] von $1{,}9 \cdot 10^{-7}$ bis $1{,}4 \cdot 10^{-7}$ ergab; wir dürfen also den isoelektrischen Punkt $1{,}7 \cdot 10^{-7}$ ansetzen, der früher für Oxyhämoglobin $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ gefunden wurde, also innerhalb der Fehlerquellen absolut identisch.

Tabelle.

Versuchs-Nr.	Mittelflüssigkeit	[H˙] gemessen	p_H	Wanderung
I	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 7 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 1 dest. Wasser 40	$7{,}3 \cdot 10^{-7}$	6,14	kathodisch
II	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 24 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 8 dest. Wasser 80	$4{,}3 \cdot 10^{-7}$	6,37	kathodisch
III	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 24 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 8 dest. Wassr 80	$3{,}8 \cdot 10^{-7}$	6,42	kathodisch
IV	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 10 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 5 dest. Wasser 80	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$	6,62	kathodisch
V	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 10 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 5 dest. Wasser 80	$2{,}2 \cdot 10^{-7}$	6,66	kathodisch
VI	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 9 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 6 dest. Wasser 80	$1{,}9 \cdot 10^{-7}$	6,74	Stillstand

[1]) Mit Leuchtgas gesättigte Flüssigkeiten geben ein Potential, das sich sehr langsam, aber richtig einstellt, und verhalten sich etwa ebenso wie wenn der Wasserstoffatmosphäre ein wenig Luft beigemischt wäre (vgl. dazu L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 162).

Tabelle (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Mittelflüssigkeit	[H˙] gemessen	p_H	Wanderung
VII	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_3$ prim. Phosphat . . 2 $^m/_3$ sek. Phosphat . . . 2 dest. Wasser 40	$1,4 \cdot 10^{-7}$	6,84	Stillstand
VIII	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 5 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 5 dest. Wasser 40	$1,2 \cdot 10^{-7}$	6,92	anodisch
IX	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 10 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 5 dest. Wasser 80	$5,8 \cdot 10^{-8}$	7,24	anodisch
X	Gewaschene Hammelblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 8 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 24 dest. Wasser 80	$4,6 \cdot 10^{-8}$	7,34	anodisch
XI	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 1 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 12 dest. Wcsser 40	$1,4 \cdot 10^{-8}$	7,84	anodisch
XII	Gewaschene Hundeblutkörper $^m/_{15}$ prim. Phosphat . . 1 $^m/_{15}$ sek. Phosphat . . . 7 dest. Wasser 40	$2 \cdot 10^{-8}$	7,70	anodisch

Zusammenfassung.

Der isoelektrische Punkt des CO-Hämoglobins liegt bei $1,7 \cdot 10^{-7}$, der Wert ist identisch mit dem isoelektrischen Punkt des Oxyhämoglobins.

Der isoelektrische Punkt des reduzierten Hämoglobins.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des reduzierten Hämoglobins bot anfänglich große technische Schwierigkeiten. Die vollkommen reduzierte Hämoglobinlösung in der erforderlichen Verdünnung und ohne Anwesenheit eines überschüssigen Reduktionsmittels bedarf nur so geringer Spuren von Sauerstoff zu ihrer Oxydation, daß sie schon beim Einfüllen in den Überführungsapparat oxydiert wurde. Die Durchführung des Problems gelang aber in der Weise, daß das Hämoglobin gleich in dem Überführungsrohre reduziert wurde und auch die Seitenflüssigkeiten durch Durchleiten von Wasserstoff ganz luftfrei gemacht wurden. Die Reduktion des Oxyhämoglobins durfte ebenfalls nur mit Hilfe eines indifferenten Gases vor-

genommen werden, weil alle chemischen Reduktionsmittel die [H˙] der Lösung in einer schwer kontrollierbaren Weise verändern. Die Ausführung zeigt folgende Skizze (Fig. 1).

Das Mittelgefäß wird mit der Lösung der gewaschenen Blutkörperchen in das Phosphatgemisch gefüllt; es wird so viel Lösung eingefüllt, daß sie das Mittelgefäß beiderseits etwas überragt. Nun wird vermittels einer bis in das Mittelgefäß ragenden Glascapillare in der Anordnung der Fig. 1 längere Zeit

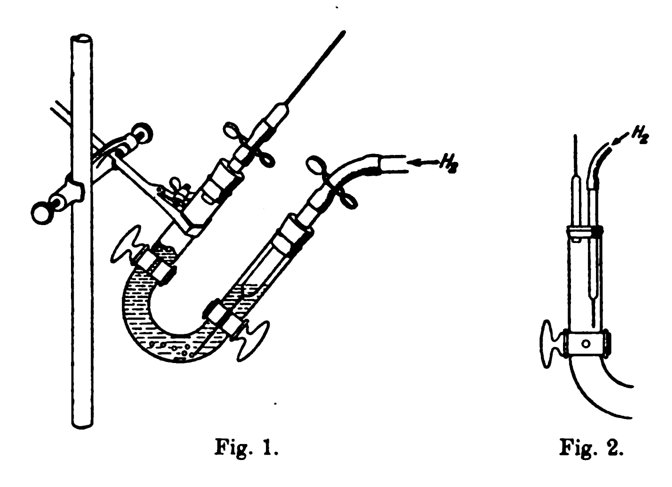


Fig. 1. Fig. 2.

Wasserstoff durch die Lösung geschickt. Dann wird das capillare Glasrohr *l* etwas zurückgezogen unter leichter Lüftung des zugehörigen Gummistopfens, die Hähne geschlossen, die Seitengefäße ausgespült, mit der betreffenden Phosphatlösung ohne Hämoglobin gefüllt und jede Seitenlösung einzeln längere Zeit nach Anordnung der Fig. 2 mit Wasserstoff durchströmt, zum Schluß das Wasserstoffzu- und -ableitungsrohr abgenommen und der Apparat wie gewöhnlich zusammengesetzt.

Die Versuche ergaben folgendes:

Tabelle.

Versuch Nr.	Mittelflüssigkeit	H˙	p_H	Wanderung
1	Gewasch. Hammelblutkörper Prim. Phosphat n/3 . . . 5 Sek. " n/3 . . . 10 Dest. Wasser 80	$5{,}3 \cdot 10^{-8}$	7,28	Anodisch

Tabelle (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Mittelflüssigkeit	H˙	p_H	Wanderung
2	Gewasch. Hammelblutkörper Prim. Phosphat . . . . 7,5 Sek. „ . . . . 7,5 Dest. Wasser 80	$1{,}2 \cdot 10^{-7}$	6,92	Anodisch
3	Gewasch. Hammelblutkörper Prim. Phosphat . . . . 9 Sek. „ . . . . 6 Dest. Wasser 80	$1{,}7 \cdot 10^{-7}$	6,77	Stillstand
4	Gewasch. Hammelblutkörper Prim. Phosphat . . . . 10 Sek. „ . . . . 4 Dest. Wasser 20	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$	6,62	Kathodisch

Am Schluß der Versuche wurde die Lösung, insbesondere der übergewanderte Anteil derselben, spektroskopisch noch einmal nachgeprüft. Es trat hierbei niemals Oxydation ein.

Es ergibt sich somit, daß der isoelektrische Punkt des reduzierten Hämoglobins mit dem des Oxy- und CO-Hämoglobin identisch ist $= 1{,}7 \cdot 10^{-7}$.

Enzymatische Versuche mit Bacillus Delbrücki.

Von

Hans Euler und Harald Cramér.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 8. Juli 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Zahlreiche, an Hefe angestellte Versuche haben gezeigt, daß der Enzymgehalt der Hefezellen durch Vorbehandlung in reproduzierbarer Weise gesteigert, und daß insbesondere die invertierende Wirkung lebender Hefezellen unter dem Einfluß verschiedener Zuckerarten wenigstens verzehnfacht werden kann. In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit[1]) haben wir gezeigt, daß die Invertasebildung an diejenigen Bedingungen geknüpft ist, unter welchen eine Neubildung des Proptoplasmas eintritt und daß also besonders ein Energie liefernder Prozeß, wie derjenige der alkoholischen Gärung, für den erwähnten Effekt erforderlich ist.

Die hier mitzuteilenden Versuche sind ursprünglich in der Absicht angestellt worden, Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, welche biologische Bedeutung die starke Vermehrung der invertierenden Wirkung durch die Gärung für die lebende Zelle besitzen kann.

Wir haben dabei an die Möglichkeit gedacht, daß das Enzym, welches Rohrzucker invertiert, gleichzeitig noch eine andere Funktion ausüben kann, welche für den Stoffwechsel der unter normalen Verhältnissen mit Rohrzucker nicht in Berührung kommenden Zellen wesentlicher ist als die Spaltung dieses Zuckers. Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir einen

---

[1]) Euler und Cramér, Zeitschr. f. physiol. Chem 88, 430, 1914. — Siehe auch diese Zeitschr. 58, 467, 1914.

Mikroorganismus untersucht, welcher Rohrzucker zwar zu spalten vermag, für welchen aber — so viel man nach dem jetzigen Stand der Kenntnisse beurteilen kann — der Rohrzucker nicht die gewöhnliche oder natürliche Nahrung ist.

Über die invertierende Wirkung von Bacillus Delbrücki war bis jetzt noch nichts näheres bekannt, und wir haben diesen Spaltpilz zur Untersuchung gewählt, da er wegen seiner technischen Bedeutung stets in größerem Maße und in konstanter reproduzierbarer Weise gezüchtet wird. Auch bietet er insofern einen günstigen Fall dar, als die von ihm ausgeübte Spaltung des Zuckers im Vergleich zu der Inversion der Saccharose langsam verläuft und also die Beobachtung der letzteren nicht stört.

Experimentelles.

Gleich bei unseren ersten Versuchen hatte es sich gezeigt, daß die für technische Zwecke angesetzten Kulturen von Bacillus Delbrücki nicht ganz frei von Hefezellen sind und deswegen für unseren Zweck nicht ohne weiteres anwendbar waren.

Es wurde deshalb im hiesigen Laboratorium dieser Spaltpilz in bekannter Weise auf Nährgelatine gezüchtet und aus diesen Kulturen in Kolben mit 500 ccm einer Nährlösung übergeimpft, die 2 % Glucose bzw. ebensoviel Milchzucker enthielt. Die weitere Heranzüchtung des Bacillus Delbrücki geschah dann in den genannten Nährlösungen in Thermostaten bei 28°. An den so erhaltenen Bakterienmassen wurde dann die Fähigkeit zur Milchsäuregärung und zur Inversion des Rohrzuckers untersucht.

a) Milchsäuregärung. Aus den Kulturkolben wurde nach kräftigem Umschütteln 25 ccm Emulsion entnommen und in einem Erlenmeyer-Kolben mit 50 ccm 10 %iger Milchzuckerlösung und 3 g $CaCO_3$ gemischt. Diese Mischung wurde dann in einen Thermostaten von 30° gestellt und von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Nach einer gewissen Anzahl Stunden wurde die Flüssigkeit zum Kochen erhitzt und im Filtrat von $CaCO_3$ wurde das Ca durch Fällung mit Ammoniumoxalat bestimmt. Wenn es sich um kleine Mengen Milchsäure handelt, werden nämlich durch das Ausäthern einer milchsäurehaltigen Flüssigkeit keine befriedigenden analytischen Resultate erzielt; es

wäre höchstens zu wünschen gewesen, daß die Milchsäure des Calciumlactates stets in Form ihres Zink- oder Silbersalzes isoliert worden wäre. Eine Notwendigkeit lag bei den hier mitzuteilenden Versuchen nicht vor. Wenn in einer späteren Untersuchung die chemische Gesamttätigkeit dieser Milchsäurebakterien untersucht werden wird, so soll auch die genannte Charakterisierung der entstandenen Säure ausgeführt werden.

b) Inversionsversuche. Für jeden Versuch wurden 10 ccm Bakterienemulsion mit 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung und 10 ccm 1%iger Lösung von NaH_2PO_4 gemischt. Die enzymatische Tätigkeit wurde mit 10 ccm 5%iger Sodalösung abgebrochen.

Da bei diesen Versuchen eine Wägung der angewandten Bakterien nicht ausführbar war, so mußte die Menge der eingeführten Mikroorganismen durch Zählung festgestellt werden, eine Aufgabe, die mit nicht geringen Schwierigkeiten verbunden ist. Herr Dr. Palm, der diese Rechnungen angestellt hat, berichtet in der folgenden Mitteilung über die Ausführung seiner Messungen.

Wir gehen nun zur Wiedergabe unserer experimentellen Ergebnisse über.

1. Vorbehandlungszeit in der Nährlösung: 70 Stunden.

a) Milchsäuregärung.

Stunden	mg CaO Lactose	mg CaO Glucose
0	3,2	3,9
4,5	3,4	4,5
21	4,6	7,4

b) Inversion.

Minuten	Lactose α^0	Lactose $K \cdot 10^4$	Glucose α^0	Glucose $K \cdot 10^4$
0	5,59	—	5,59	—
60	5,56	0,3	5,36	2,3
120	5,50	0,4	5,18	2,1
180	5,46	0,4	4,97	2,1
∞	— 1,70	—	— 1,79	—
Dreh. d. Nährlös.	+ 0,19	—	+ 0,06	—

2. Vorbehandlungszeit in der Nährlösung: 97 Stunden.

Milchsäuregärung.

Stunden	mg CaO Lactose	mg CaO Glucose
0	3,2	3,6
18,0	3,8	3,8
46,5	31,0	78,0

3. Vorbehandlungszeit in der Nährlösung: 117 Stunden.

Inversionsversuch.

Minuten	Lactose		Glucose	
	α^0	$K \cdot 10^4$	α^0	$K \cdot 10^4$
0	5,59	—	5,59	—
60	5,55	0,40	4,72	9,1
120	5,49	0,50	3,97	9,0
∞	— 1,79	—	— 1,79	—
Nährlös.	+ 0,14	—	± 0	—

4. Vorbehandlungszeit in der Nährlösung: 165 Stunden.

Inversionsversuch.

Minuten	Lactose		Glucose	
	α^0	$K \cdot 10^4$	α^0	$K \cdot 10^4$
0	5,50	—	5,50	—
60	5,45	0,5	4,07	16
120	5,40	0,5	2,82	17
∞	— 1,76	—	— 1,76	—
Nährlös.	+ 0,20	—	± 0	—

Die zur den vorstehenden Versuchen angewandten Bakterienaufschlemmungen enthielten nach den Messungen von Herrn Palm (siehe die folgende Mitteilung) die folgende Anzahl Zellen per Kubikmillimeter:

Nach Stunden	Milchzuckerlösung	Glucoselösung
0	261	253
70	572	3400
97	574	9800
117	488	12580
165	300	9500

Reduziert man die oben angegebenen Inversionskonstanten auf die gleiche Zellenzahl, so erhält man als Werte für den Quotienten $\frac{10^4 \cdot K \cdot 10^4}{\text{Zellenzahl per cmm}}$ die folgenden Zahlen:

Dauer der Vorbehandlung Stunden	Milchzucker	Glucose
70	7,0	6,5
117	9,2	8,2
165	16,6	17,4

Erhebliche Versuchsfehler lassen sich natürlich bei der Ermittlung dieser Quotienten nicht vermeiden. Man wird demgemäß dem regellosen Unterschied zwischen den beiden parallelen Reihen keine Bedeutung beimessen. Immerhin ist es bemerkenswert, daß die angewandten Methoden so gute Resultate ergeben haben.

Es ist zweifellos, daß durch die Vorbehandlung die Inversionsfähigkeit (der Invertasegehalt) der Zellen von B. Delbrücki um mehr als 100% gesteigert wird.

Sehr auffallend ist, daß die Vorbehandlung mit Lactose angenähert den gleichen Effekt hat wie die Vorbehandlung mit glucosehaltiger Nährlösung. Im Wachstum macht sich nämlich ein ganz enormer Unterschied bemerkbar. Dies zeigt die nebenstehende Figur. Dieselbe stellt den zeitlichen Zuwachs des B. Delbrücki in lactose- und in glucosehaltiger Nährlösung dar. Die Kurve ist in der Weise erhalten worden, daß die von Herrn Palm angegebenen Versuchsreihen auf einen gemessenen Anfangswert für die Bakterienzahl, nämlich 260 Zellen pro Kubikmillimeter, reduziert worden sind.

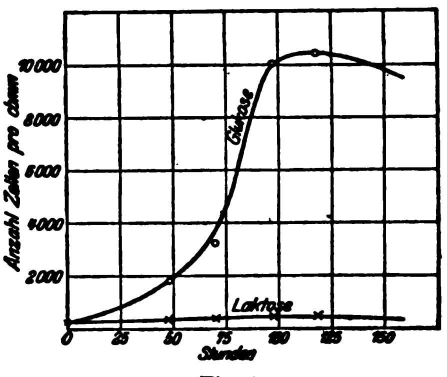


Fig. 1.

Das Wachstum auf Lactose ist sehr gering. Es liegt sogar nahe anzunehmen, daß der Bacillus Delbrücki die Lactose überhaupt als Nahrung nicht benützt hat, und daß das beobachtete Wachstum von den als Verunreinigungen im angewandten Präparat (Kahlbaum) anwesenden Spaltprodukten Glucose und Galaktose herrührt.

Wie dem auch sei, jedenfalls hätte man nach unseren

früheren, an Hefe gewonnenen Ergebnissen erwarten sollen, daß die Größe der Invertasebildung mit dem Wachstum der Zellen einigermaßen parallel geht.

Die Untersuchungen über die Dynamik der Enzymwirkungen bei Bacillus Delbrücki werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

Bacillus Delbrücki besitzt eine beträchtliche Inversionsfähigkeit gegen Rohrzucker.

Die Inversionsfähigkeit (der Invertasegehalt) kann durch Vorbehandlung der Zellen in zuckerhaltigen Nährlösungen weit über 100 % gesteigert werden.

Bemerkenswert ist, daß diese Enzymbildung in einer lactosehaltigen Nährlösung, in der nur sehr geringes Wachstum stattfindet, quantitativ ebenso verläuft, wie in einer Glucoselösung, in der sich die Zellen normal vermehren.

Über die Vermehrung von Bacillus Delbrücki in lactose- bzw. glucosehaltigen Nährlösungen.

Von

Bj. Palm.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 8. Juli 1914.)

Parallel mit einer Untersuchung über die Enzymbildung in Bacillus Delbrücki, über die Prof. v. Euler in der vorstehenden Mitteilung berichtet hat, wurden Bestimmungen der Bakterienmenge der in dieser Hinsicht zu untersuchenden Kulturen ausgeführt.

Ehe ich auf Methodik und Resultate meiner Zählungen eingehe, möchte ich in aller Kürze einige besonders diagnostisch wichtige Merkmale des untersuchten Bacillus hervorheben.

Die erste Beschreibung von B. Delbrücki — auch Kulturmilchsäurebacterium genannt — stammt von Leidmann[1]), der die betreffende Art zuerst isoliert hat; dieselbe ist aber sehr knapp abgefaßt, und ich ziehe es deshalb vor, mich an die von Henneberg[2]) bei einer Nachuntersuchung gewonnenen Tatsachen zu halten.

Die Zellen sind anfänglich kurz und dünn, die Länge derselben kann zwischen 2,8 und 7 μ, die Breite zwischen 0,4 und 0,7 μ schwanken. Die Zellfäden können beträchtliche Längenmaße aufweisen, von 100 bis 973 μ. In jüngeren Kulturen sind sie teils einzeln zu finden, teils zu zwei oder mehreren in geraden oder winkeligen Linien verbunden. Sehr oft findet man gänzlich abweichende Zellformen, die z. B. in Spiralen wachsen können, aber stets nur unter bestimmten Kultur-

[1]) Centralbl. f. Bakt. [2] 2, 281, 1896.

[2]) Wochenschr. f. Br. 18, Nr. 30, 1901; Autorreferat im Centralbl. f. Bakt. II. Abt., 1902, 185.

bedingungen, so in Maischeagarkulturen. Mit zunehmendem Alter der Kulturen werden die Zellen kürzer und die Zellketten kurzgliedriger.

Hefewasser, Hefeextrakt sowie ungehopfte Würze und Maische bieten B. Delbrücki die günstigsten Entwicklungsmöglichkeiten dar. Die künstlichen Nährlösungen sind weitaus ungünstiger. Das Wachstum unserer Art hat sich als viel kräftiger in Stichkulturen als auf Oberflächenkulturen erwiesen; die erzeugten Kolonien waren hier für gewöhnlich annähernd rund und von weißer bis weißgelblicher Farbe. Auf Agar-Agar hat man ein Wachstumsoptimum bei 45° gefunden; das Minimum liegt bei 18°. Feuchte Wärme tötet bei 68 bis 70° in einer Minute, trockene bei 93 bis 96°. B. Delbrücki bildet Säure aus Dextrin, Glucose, Fructose, Maltose, Galaktose und Rohrzucker. Keine merkliche Säuerung wird in Arabinose, Dulcit, Erytrit, Inulin, Mannit, Lactose, Quercit, Raffinose, Rhamnose, Stärke und Trehalose erzeugt.

Versuchsanordnung.

Als Impfmaterial diente eine Kultur von Bacillus Delbrücki aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin. Aus demselben wurde eine Reinzucht auf Nähragar + Traubenzucker in Röhrchen angelegt. Der Nähragar war folgendermaßen zusammengesetzt:

1,5 % Agar-Agar,	1,0 % Liebigs Fleischextrakt,
1,0 % Pepton,	0,5 % Kochsalz.

Diesem Nähragar wurden 0,3 % Traubenzucker zugesetzt.

Auf jeden Versuchskolben kam in der Regel eine Röhre mit Impfmaterial. Das Beschicken der Kolben mit dem Bakterienmaterial wurde in folgender Weise ausgeführt. Nachdem die Röhrchen durch aufeinanderfolgendes Waschen in Alkohol, Schwefelsäure und Äther sterilisiert worden waren, wurden sie so schnell wie möglich bis zur halben Länge in den Kolben eingeführt und dann mit einer sterilisierten Zange zerbrochen. Dadurch wurde ein lästiges und gefährliches Herausnehmen der Impfmasse aus den Röhrchen vermieden. Dieses Verfahren hat sich als sehr zweckmäßig herausgestellt, da in keinem Falle eine Infektion der Kolben eingetreten ist.

Die Kolben, in die übergeimpft wurde, hatten einen Raum-

inhalt von 2 l und enthielten 1 l Nährlösung von folgender Zusammensetzung per Liter:

0,25 g Magnesiumsulfat,
5,0 g Orthomonokaliumsulfat,
4,0 g Asparagin.

Dazu kommt in den mit 3 bis 10 bezeichneten Versuchen 4 g Lactose, in den mit 11 bis 20 bezeichneten Versuchen 4 g Glucose.

Nach dem Überimpfen wurden die Kolben kräftig geschüttelt, um möglichst gleichmäßige Verteilung der Bakterien in der Nährlösung zu erhalten. Sämtliche Kolben wurden im Thermostaten bei 28^0 gehalten.

Beim Zählen der Bakterien ist folgendes Verfahren zur Anwendung gekommen.

Die Zählungen sind mit Hilfe der Kochschen Plattenmethode ausgeführt worden. Zwar wäre vielleicht eine andere Methode bei dem relativ schlechten Wachstum von B. Delbrücki in künstlichen Nährmedien vorzuziehen gewesen; die Hauptforderung, daß die zwei Versuchsreihen miteinander verglichen werden können, wird jedoch auch hier erfüllt. Von den anderen mehr oder weniger gebräuchlichen Methoden schien mir keine sich in dieser Hinsicht so gut bewährt zu haben[1]).

Aus jedem Kolben wurde mit einer gradierten Pipette in steriler Weise 1 ccm der Bakterienemulsion entnommen und in einen Kolben mit 500 ccm sterilisiertem Wasser übergeführt. Nach Umschütteln des Inhaltes wurde wiederum aus diesem 1 ccm entnommen und in eine Röhre eingeführt, die 10 ccm Nährgelatine enthält; nach kräftigem Umschütteln wurde diese Mischung in sterile Petrischalen ausgegossen. Die Nährgelatine war in die genannten Röhren mit Hilfe einer sterilisierten 10-ccm-Pipette eingeführt worden.

Von der letzterwähnten wässerigen Emulsion wurde 1 ccm in eine Röhre mit 10 ccm sterilem Wasser übergeführt. Nach gründlichem Umschütteln wurde hieraus 1 ccm Lösung genommen, der in eine Röhre eingeimpft wurde, die 10 ccm Nährgelatine enthielt, aus welcher Platten gegossen wurden.

---

[1]) Ich kannte damals nicht die jüngst veröffentlichten Methoden von Aumann, P. Th. Müller und Viehoever (siehe unten im Text).

Ferner wurden der gleichen Lösung von 500 ccm 1 ccm entnommen und in ein Reagensglas übergeführt, das 20 ccm sterilisiertes Wasser enthielt. Nach Umschütteln wurden diese mit 10 ccm Nährgelatine gemischt, worauf die Mischung in Petrischalen entleert wurde.

Bei einigen Rechnungen kam eine weitere Verdünnung zur Anwendung. Aus dem obenerwähnten Kolben mit 500 ccm Bakterienemulsion wurde nach Umschütteln des Inhaltes 1 ccm entnommen, der in einen Kolben mit 200 ccm sterilisiertem Wasser übergeführt wurde. Aus der so erhaltenen Emulsion wurde in gewöhnlicher Weise 1 ccm entnommen und mit 10 ccm Nährgelatine gemischt. Mit dieser Mischung wurden dann Platten gegossen.

Für die Zählungen kamen somit 4 verschiedene Verdünnungsgrade zur Anwendung, nämlich:

1:500 1:10000
1:5000 1:100000

Von jeder Verdünnung wurde eine Platte gegossen. Doch kamen für die Zählungen, die innerhalb der 4 ersten Tage nach Beginn des Versuches ausgeführt wurden, nur die 3 niedrigsten Verdünnungen zur Anwendung, in den folgenden Tagen nur die 3 höchsten Verdünnungen. Die in den Tabellen angegebene Bakterienzahl ist also das Mittel zwischen der Kolonieanzahl der 3 Platten, nachdem die erforderlichen Multiplizierungen ausgeführt sind. Zu den Zählungen der Kolonien auf den Platten wurde ein Wolffhügel-Rechenapparat mit Lupe angewandt; jede Platte wurde erst 8 Tage nach der Anlage untersucht bzw. gezählt. Die Ergebnisse sind in den beiden folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle a.

Milchzuckerkulturen. Zellenzahl per Kubikmillimeter.

Stunden	Versuch				
	2	3	4	5	7
0	261	308	262	243	378; 141
48	393	—	—	—	—
70	—	572	—	—	—
97	—	—	574	—	—
117	—	—	—	488	—
165	—	—	—	—	333; 223

Tabelle b.

Glucosekulturen. Zellenzahl per Kubikmillimeter.

Stunden	Versuch				
	2	3	4	5	7
0	253	279	253	254	272
48	1800	—	—	—	—
70	—	3400	—	—	—
97	—	—	9800	—	—
117	—	—	—	11080	—
165	—	—	—	—	9500

Die erhaltenen Zahlen werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der enzymatischen Untersuchungen besprochen werden. Ich möchte aber hier hervorheben, daß ich viel größere Zahlen erwartet hätte. Der geringe Zuwachs beruht wohl auf dem Umstand, daß B. Delbrücki nur schlecht in künstlichen Nährmedien wächst, zumal bei so niedriger Temperatur, wie die von mir eingehaltene. Eine Ursache ist vielleicht auch die Anwendung des Plattenkultur-Verfahrens, wo künstliches Nährsubstrat verwendet wurde.

Die Methoden zur Bestimmung der Vermehrung der Zellenzahl.

Für die obigen Versuche habe ich mich, wie erwähnt, der alten Kochschen Plattenmethode bedient. Dieselbe wird bekanntlich seit langer Zeit vielfach verwendet und hat trotz aller anhaftenden Mängel doch vielleicht die besten Dienste unter den allgemein verbreiteten Zählmethoden für Bakterien geleistet. Daß die Fehlerquellen beim Gebrauch dieser Methode jedoch nicht unbeträchtlich sind, geht aus den vielen Versuchen hervor, eine möglichst einwandfreie Methode ausfindig zu machen. Indessen hat bis jetzt keine das Zählverfahren von Koch verdrängen können.

Da das Studium der Enzymbildung und Anpassung im hiesigen Laboratorium an Bakterien in mehrfacher Hinsicht fortgesetzt wird und eine genaue Zählmethode für derartige Untersuchungen von wesentlicher Bedeutung ist, so halte ich es für angebracht, hier an meine Versuche eine Übersicht über die wichtigsten vorhandenen Zählmethoden zu geben, um so mehr, als dieselben auch bei andern enzymatischen und bio-

chemischen Versuchen zur Anwendung kommen können. Bei der jetzt so enorm angewachsenen bakteriologischen Literatur fordert es nämlich einen großen Aufwand an Zeit, die verschiedenen Methoden und Modifikationen, die öfters in Spezialarbeiten über Boden-, Milch- und Wasserbakteriologie enthalten sind, zusammenzustellen[1]).

Die Kochsche Methode brauche ich hier wohl nicht näher zu behandeln und verweise nur auf das im Anfang dieser Mitteilung Gesagte. Nur einige Bemerkungen möchte ich noch hinzufügen.

Um möglichst genaue und einwandfreie Resultate zu erzielen, ist folgendes besonders zu berücksichtigen: Beim Herstellen der verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Flüssigkeit ist ein längeres Verweilen der Zellen im Verdünnungswasser tunlichst zu vermeiden, da mehrere Autoren einen schädigenden Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit der Bakterien durch das Wasser beobachtet haben wollen. Die Wahl des Nährsubstrates erfordert besondere Sorgfalt. Damit die zu zählende Bakterienform in dem für ihre Entwicklung günstigsten Medium wächst, müssen die vorteilhaftesten Kulturbedingungen vorhanden sein. Auch Temperatur, Beschattung und Luftfeuchtigkeit müssen je nach der betreffenden Art gewählt werden. Die Zählung der erhaltenen Kolonien geschieht am besten frühestens 2 bis 3 Tage nach Guß der Platten. Gewöhnlich erweist es sich am vorteilhaftesten noch ein paar Tage länger zu warten. Dies richtet sich natürlich hauptsächlich nach der Zuwachsgeschwindigkeit der Bakterienart.

Die Zählung kann man, wie es bei meinen obenerwähnten Rechnungen geschehen ist, mit Hilfe eines Zählapparates nach Wolffhügel ausführen. Die genauesten Resultate erhält man, wenn sämtliche Kolonien in einer Petrischale gezählt werden; beschränkt man sich darauf, eine geringere Anzahl von Quadraten zu zählen, so muß der Flächeninhalt der Schale und per gezählten Quadrate ermittelt werden. Das Ergebnis der

[1]) Ich muß bei dieser Gelegenheit erwähnen, daß mir hier ein Teil der einschlägigen Literatur nicht zugänglich war. So habe ich z. B. nicht im Original lesen können: Kühl, Zeitschr. f. öffentl. Chem. 28, 1912.

Zählung ist natürlich in beiden Fällen von der angewandten Menge Wasser auf 1 ccm zu reduzieren.

Ist die Zahl der Kolonien eine sehr große — über 1500 aber auch nur in diesem Fall —, so kann es angemessen sein, die Zählung unter dem Mikroskop zu verrichten. Damit aber dieses Verfahren anwendbare Werte gebe, so muß sowohl die Verteilung der Bakterien auf der Platte wie die Dicke der Platte vollkommen gleichförmig sein. Ferner sind dann an das anzuwendende Mikroskop besondere Anforderungen zu stellen: entweder ein großer Objekttisch oder ein nach rückwärts ausgebogenes Stativ. Da man indessen durch geeignete Verdünnungen eine große Kolonieanzahl der Platten vermeiden kann, ohne daß die Genauigkeit erheblich leidet, dürfte es überflüssig sein, dieses Zählverfahren weiter zu besprechen. Ich verweise statt dessen auf die ausführliche Beschreibung in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **6**, 329 ff. und Spitta und Ohlmüller, Untersuchung nnd Beurteilung des Wassers und Abwassers, 3. Auflage 1910, S. 267.

Auch bei Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln ist die Methode keineswegs einwandfrei. So ist es z. B. nicht möglich, die Bakterien beim Schütteln vollständig voneinander zu trennen; oft kommt es vor, daß zwei oder mehrere Zellen aneinander hängen bleiben und dadurch nur zur Bildung einer Kolonie Anlaß geben. Dadurch geben oft genug die gefundenen Werte Anlaß zu Fehlern. Ferner ist die Anzahl der Platten, die überhaupt der Zählung unterworfen werden darf, ziemlich beschränkt. Eine Verdünnung, aus der sich weniger als etwa 50 Kolonien auf der Platte entwickeln, wird am besten nicht berücksichtigt. Zu den Nachteilen der Methode ist auch der erwähnte Umstand zu rechnen, daß die Zählung erst nach Verlauf von 4 bis 6 Tagen ausgeführt werden kann. Wenn es sich um schnelles Ermitteln des Keimgehaltes handelt, ist diese lange Dauer sehr lästig. Durch die Entwicklung von Schimmelpilzen oder Gelatine verflüssigenden Bakterien, die oft schwierig fern zu halten sind, kann die Brauchbarkeit der Platten auch erheblich beeinträchtigt werden.

Dieser Nachteile wegen hat die Methode mehrere Modifikationen erfahren.

Bei geringer Bakterienzahl, wie z. B. Trinkwasser, setzt

man zu einem größeren Volumen Wasser solche Zusätze, wie z. B. Ferrisulfat und Soda (Ficker)[1]) oder Liquor ferri oxychlorati (O. Müller)[2]), aus denen ein Niederschlag entsteht, der die Bakterien mitreißt. Dadurch wird eine Anreicherung der vorhandenen Keime erzielt, die dann auf verschiedenen Nährböden gezüchtet werden.

Ganz neuerdings hat P. T. Müller[3]) diese Methode noch weiter ausgearbeitet und zur quantitativen Bestimmung der Bakterienzahl brauchbar gemacht.

Indem man den erhaltenen Bakterienniederschlag — statt ihn auf Platten zu züchten — einer Zählung unter dem Mikroskop unterwirft, erhält man eine Methode, die vielfach angewendet werden dürfte. Speziell zur Untersuchung bakterienarmer Flüssigkeiten dürfte Müllers Methode vorteilhaft sein, um so mehr als das Verfahren sich leicht innerhalb 1 Stunde ausführen läßt.

Man verfährt nach Müller folgendermaßen: In einem Meßzylinder werden 100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 5 ccm Formalin versetzt, um während der Sedimentierungszeit Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Nach Zusatz von 5 Tropfen Liquor ferri oxychlorati soll durch Einblasen von Luft mittels einer Pipette eine gründliche Mischung erzielt werden. Nach $^1/_2$ stündigem Stehen ist ein flockiger Niederschlag abgeschieden. Die überstehende klare Flüssigkeit gießt man dann vorsichtig ab und setzt dem Sediment 5 Tropfen konzentrierter alkoholischer Gentiana-Violettlösung zu. Der Niederschlag wird jetzt in ein Zentrifugiergläschen entleert und nach etwa einer Minute dauerndem Verweilen in kochendem Wasser kurze Zeit zentrifugiert[4]).

---

[1]) Hygienische Rundschau **1904**, Nr. 1. Zitiert nach O. Müller (siehe unten).

[2]) Zeitschr. f. Hygiene **51**, 9, 1905.

[3]) Arch. f. Hygiene **75**, 191, 1911 bis 1912.

[4]) Aumann (Centralbl. f. Bakt. (2), **33**, 634, 1912) ist der Ansicht, daß eine Anreicherungsmethode wie z. B. die Müllersche in Verbindung mit der Untersuchung in der Quarzkammer bessere Ergebnisse geben dürfte, als in der Kombination mit einer Färbemethode. Ich glaube jedoch, die Müllersche Methode ist die einfachste und demgemäß weniger zeitraubend.

Ist die Müllersche Methode für bakterienarme Flüssigkeiten besonders gut geeignet, so kann die von Eberle[1]) und Klein[2]) begründete, ausschließlich bei der Untersuchung von Wässern usw., deren Keimgehalt ein sehr hoher ist, Anwendung finden. Diese Zählmethode gibt bei möglichster Einfachheit der Manipulationen vorzügliche Resultate.

Die Zählung geschieht auf eine sehr einfache Weise. In einem Uhrglase wird zu einem bestimmten Quantum (z. B. zu $^1/_2$ ccm) einer flüssigen Kultur oder der Emulsion einer festen Kultur in physiologischer Salzlösung ein gleiches Quantum Anilinwassergentianaviolett (Ehrlich) zugesetzt. Die beiden Flüssigkeiten werden durch eine Platinöse einen Augenblick gemischt; nach 2 bis 3 Minuten sind die Bakterien schon sehr intensiv gefärbt.

Nachdem die Flüssigkeiten jetzt tüchtig umgerührt worden sind, wird mittels einer geaichten Platinöse ein also bekanntes Quantum der Flüssigkeit auf einem vollständig fettfreien Deckgläschen gleichmäßig ausgestrichen. Dabei wird die gefärbte Bakterienemulsion mit einer Gelatinelösung gemischt und über das Glas verteilt. Dieses Verfahren trägt dazu bei, die Entfärbung der Bakterien zu verhindern. Nach Trocknen des Präparates an der Luft wird dasselbe nicht flambiert, sondern sofort und ohne Ausspülen in Xylol-Kanadabalsam eingeschlossen.

Das Zählen von 50 Gesichtsfeldern genügt meistenteils, bei großer Bakterienzahl ist ein Okularnetzmikrometer anzuwenden.

Hehewerth[3]), der die praktische Anwendbarkeit der Kleinschen Methode geprüft hat, zeigte, daß dieselbe mit wirklichem Nutzen nur dann angewandt werden kann, wo es sich um einen Bakteriengehalt von einigen Millionen per Kubikzentimeter handelt. Ein weiterer Nachteil ist der, daß die nach dieser Methode ausgeführten Zählungen sich auf eine so unsichere Dosierung wie die durch eine Platinöse beziehen. Bekanntlich ist ja die Aufnahmefähigkeit einer Platinöse wesentlich abhängig von der Konsistenz der aufgenommenen Flüssigkeit.

Ein offenbar noch einfacheres Verfahren zur Bakterien-

---

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. [1] **19**, 2, 1896.

[2]) Arch. f. Hygiene **34**, 834, 1901.

[3]) Arch. f. Hygiene **39**, 321, 1901.

zählung hat Winterberg[1]) angewandt. Er bediente sich der Thomas-Zeißschen Blutkörper-Zählkammer zur Ermittlung der Bakterienzahl. Hier wird die Rechnung indessen natürlich in hohem Grade durch die Eigenbewegung und Molekularbewegung der Bakterien erschwert, ferner durch das Vorkommen von Bakterienanhäufungen, die nicht trennbar waren, und von Verunreinigungen. Da sie ungefärbt waren, waren sie auch schwer zu zählen, und dazu kommt als Nachteil, daß die Zählung unmittelbar geschehen muß, damit eine nachträgliche Vermehrung der Bakterien das Resultat nicht beeinflußt.

Unter der Voraussetzung, daß wenigstens den wesentlichsten Nachteilen der Winterbergschen Methode abgeholfen werden kann, dürfte dieselbe vielfach zur Anwendung kommen. Tatsächlich scheint es, daß man sich durch die von Viehoever[2]) kürzlich vorgeschlagenen Verbesserungen dieser Methode dem Ideal für ein Bakterienzählverfahren genähert hat, wenigstens unter einer Voraussetzung, auf die ich unten zurückkomme.

Durch Zusatz von 1 bis 5 % Schwefelsäure ist es Viehoever geglückt, die Eigen- und Molekularbewegung der Bakterien aufzuheben und ihre Absetzung in der Zählkammer zu beschleunigen. Frisch bereitetes Kupferoxydammoniak beseitigt die Verunreinigungen und verhindert die Zellvermehrung. Schließlich färbt er die Bakterien in der kupferhaltigen Zählflüssigkeit mit Methylenblaulösung. In bezug auf die Reagenzien ist folgendes zu bemerken. Zur Herstellung des Kupferoxydammoniaks füllt man in eine lange, mit Schlauch und Quetschhahn verschlossene Röhre Kupferspäne, übergießt sie mit 30 % Ammoniak (0,91 spez. Gew.) und deckt oben mit einer Glaskappe. Die beim Öffnen des Hahnes ablaufende Flüssigkeit gießt man so lange zurück, bis dieselbe die Fähigkeit hat, reine Cellulose zu lösen. Das Reagens ist wenig haltbar. Die Methylenblaulösung wird durch Sättigung des Farbstoffes in 95 %igem Alkohol hergestellt; 1 Teil wird mit 10 Teilen keimfreien Wassers gemischt, worauf Filtration erfolgt.

Die Ausführung der Zählung mag in Viehoevers Originalmitteilung nachgesehen werden.

---

[1]) Zeitschr. f. Hygiene **29**, 75, 1889.

[2]) Centralbl. f. Bakt. [2] **39**, 290, 1913.

Sieht man bei schwacher Vergrößerung unregelmäßige Verteilung oder Häufchen auf dem Mikrometernetz, so müssen neue Präparate gemacht werden. Erst nachdem die Bakterien sich vollständig abgesetzt haben, kann man das Zählen beginnen; schon nach 15 bis 30 Minuten ist alles in völliger Ruhe. Wenn man Gelegenheit hat, alle 400 Quadrate zu zählen, erhält man natürlich die zuverlässigsten Resultate, indessen kann man sich mit der Zählung einer geringeren Anzahl begnügen.

Ferner ist zu bemerken, daß die Zählkammer zwischen den Zählungen einwandfrei gereinigt werden muß. Viehoever macht hierüber keine Angaben. Winterberg empfiehlt:

1. Abspülen in Sublimat (1 : 2000) und Abtrocknen mittels Hirschlederlappen;
2. Abspülen mit Aqua dest.;
3. Abspülen mit 60 %igem und absolutem Alkohol;
4. Abspülen mit Äther, und dann
5. Durchziehen durch die Flamme bis zum völligen Trocknen.

Nach Aumann[1]) aber ist es „auf diese Weise gar nicht möglich, eine absolut reine und sterile Zählkammer zu erzielen“. Verhält es sich so, so lassen sich nach der Methode von Viehoever kaum zuverlässige Resultate gewinnen. An Stelle einer Glaskammer schlägt Aumann — bei der Diskussion der Möglichkeit einer ultramikroskopischen, quantitativen Bestimmung der Bakterienzahl im Wasser — eine Kammer aus Quarz vor, wie sie von Zeiß im Handel geführt wird. Diese Quarzkammern sind säurefest und hitzebeständig und liefern bei geeigneten Reinigungsverfahren stets einwandfreie Resultate.

Die Viehoeversche Methode würde also, wenn Aumann recht hat, nur in Kombination mit einer Quarzzählkammer befriedigende Resultate ergeben, die dann aber auch als völlig einwandfrei anzusehen wären. Ich glaube, es wäre der Mühe wert, diese Kombination näher zu studieren.

Zum Schluß möchte ich noch mit einigen Worten eine von Aumann[2]) neulich versuchte Methode, mit dem Ultramikroskop mit Dunkelfeldbeleuchtung direkt die Zählung der Bakterien im Wasser vorzunehmen, berühren. Nach ihm gelingt dies

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. [2] 33, 626, 1912.
[2]) Centralbl. f. Bakt. [2] 21, 307, 1911.

sehr leicht in einer gewöhnlichen Zählkammer nach Türk. Als großen Vorteil dieser Methode hebt er die Schnelligkeit hervor, mit der beispielsweise die Zählung von Wasserbakterien vorgenommen werden kann, und die bedeutend größeren Zahlen, die erhalten werden im Vergleich zu den Ergebnissen der Plattenmethode, was auf eine vollständigere Zählung hindeutet. Nun hat, wie bereits erwähnt, Aumann selbst auf die Fehlerquellen der Glaszählkammer hingewiesen und außerdem den praktischen Nutzen der Aumannschen Methode in Zweifel gezogen. Mit den von Aumann eingeführten Verbesserungen hat sich die Anwendbarkeit der Methode erweitert, aber trotzdem scheint mir dieselbe noch wenig erprobt zu sein, so daß ein kurzer Hinweis auf dieselbe genügen mag.

Beiträge zur physiologischen Wirkung einiger proteinogener Amine.

Von

Fr. Vanýsek.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der k. k. böhmischen Universität Prag.)

(Eingegangen am 12. Juli 1914.)

Mit 4 Figuren im Text.

Bei Gelegenheit toxikologischer Untersuchungen über die Wirkung proteinogener Amine bemühte ich mich auf Anregung des Herrn Prof. v. Lhoták, eine Methode ausfindig zu machen, die es ermöglichen würde, in einer gegebenen, wirksamen Mischung, die die Anwesenheit einer Aminobase voraussetzen läßt, das Vorhandensein eines der wichtigen Amine auch tatsächlich nachzuweisen.

Pauly beschreibt eine charakteristische Reaktion auf Histidin: Rotfärbung durch Diazobenzolsulfosäure.

Das Histamin gibt nach Ackermann dieselbe Reaktion, ähnlich wie die Bromwasserreaktion nach Knoop.

Ich war bemüht, an dem überlebenden Darme verschiedener Tiere (Katze, Kaninchen, Hund) eine biologische Reaktion ausfindig zu machen, die für die wichtigsten Amine — das Histamin und das Tyramin — charakteristisch wäre. Die Versuche, die ich zu diesem Zwecke bisher unternahm, lieferten jedoch keine so eindeutigen Resultate, daß es schon jetzt möglich wäre, dieselben zur Ausarbeitung einer einwandfreien biologischen Methode zum Nachweis der geprüften Amine zu benützen. Wir beschränken uns deshalb bloß auf die Mitteilung einiger interessanter Befunde, die die physiologische Wirkung einiger Amine näher beleuchten.

Von dem Dünndarm einer Katze wurden etwa 2 cm lange Streifen geschnitten und ihre Bewegungen nach der Magnusschen Methode registriert. Als Bad benützten wir die Tyrodsche Lösung. Der Zylinderinhalt betrug genau 100 ccm, die Temperatur 38°. Der Versuch wurde immer so angeordnet, daß so lange wie möglich die Peristaltik des Darmes registriert wurde und erst nach 5 bis 10 Minuten langem regelmäßigem Gange der Trommel wurde die zu untersuchende Lösung dem Bade beigegeben. Die weiter im Text angeführten Dosen wurden immer auf 100 ccm Badeinhalt appliziert.

Das in den Versuchen verwendete Histamin und Tyramin stammt von der Firma Hoffmann-La Roche.

Die Darmschlinge einer normalen Katze vollführt in Tyrodscher Lösung regelmäßige, peristaltische Bewegungen. Nach Applikation von 0,1 g Magnesiumchlorid (100 ccm Lösung) macht sich eine auffallende Hemmung der Darmbewegungen bemerkbar. Als die Peristaltik gänzlich geschwunden und der Tonus bedeutend gesunken war, setzten wir der Lösung 0,01 g Pilocarpin zu (auf 100 ccm). Der Zustand des Darmes blieb unverändert. Die kleine Dosis von Physostigmin wirkt unbedeutend. Beide Dosen haben bei gleichzeitig potenzierter Wirkung ebenfalls einen kleinen excitierenden Einfluß. (An dem Darmpräparate kann man diese potenzierte Wirkung beider Alkaloide sehr schön demonstrieren; die Wirkung von 2 mg Pilocarpin + 2 mg Physostigmin ist gleich der Wirkung von 6 mg Pilocarpin.) Strophanthin in einer Dosis von $^1/_{10}$ mg wirkt ebenfalls sehr schwach. Die durch Magnesiumchlorid hervorgerufene Hemmung wird nur durch das Histamin vollkommen beseitigt. 0,2 Ampel Imido-Roche auf 100 ccm Lösung (Histamin in Verdünnung 2 : 1000000) rufen in einem ganz innerten Präparate nur eine regelmäßige Peristaltik, in reizbaren Präparaten beträchtliche Tonussteigerung mit lebhafter Peristaltik hervor. Unter den anorganischen Exzitantien, welche die durch Magnesiumchlorid hervorgerufene Hemmung zu beseitigen imstande sind, ist Bariumchlorid ($^1/_2$ bis 1 dcg : 100) und auch das Natrium jodatum (2 bis 4 dcg : 100) zu nennen. In dem letztgenannten Stoffe erkannte ich auch einen Antagonisten der hemmenden Wirkung des NaCl (5 dcg). (Das NaJ bringt in einer Dosis von 2 dcg : 100 den Sphincter ani des Hundes zu

einer starken Contraction.) Bei dem Experimente mit Histamin ist darauf zu achten, daß 1. der Darm nicht von einer trächtigen Katze stammt und 2. auch nicht während der Lactation genommen wird. Ein solcher Darm ist nämlich für autonome Faktoren überempfindlich und man kann bei ihm die durch Magnesiumchlorid verursachte Hemmung schon mit Physostigmin beseitigen. Ferner sei auch erwähnt, daß selbst bei einer frischen Darmschlinge einer normalen Katze durch die Dosis von 1 dcg Magnesiumchlorid die Peristaltik sich für eine längere Zeit nicht unterdrücken läßt.

Der Darm erschlafft zwar nach doppelter Dosis, aber das Histamin erzeugt dann in der genannten Verdünnung meistens nur eine vorübergehende Belebung der peristaltischen Bewegungen.

Wie also aus dem Gesagten ersichtlich, ist das Histamin ein energisches Muskelexcitans. Mit dieser Eigenschaft hängt eine andere Beobachtung zusammen: Histamin ist ein gewaltiger Antagonist der hemmenden Darmwirkung des Chloroforms. Chloroformdosen, die von einem durch Histamin excitierten Präparate vertragen werden, würden bei einem normalen Präparate Tonussenkung und Schwinden der Peristaltik hervorrufen. Andererseits ist es wieder bei tiefer Narkose (etwa $^1/_2$ bis 1 ccm 2$^0/_0$ Chloroform auf 100 ccm Lösung) sehr leicht, durch Anwendung von Histamin schon in einer Verdünnung 1 : 1000000 dieselbe zu beseitigen.

Da das Histamin sichtlich nebst einer Reizung der autonomen Endigungen und des Plexus Auerbachii auch auf den Muskel seine Wirkung ausübt, leistet es der hemmenden Wirkung des Atropins bedeutenden Widerstand, ebenso wie das Strophanthin. Wenn zur Hemmung eines durch Pilocarpin excitierten Darmes nur eine kleine Dosis Atropin (einige mg) genügt, ist zum Paralysieren der durch $^2/_{10}$ Ampulle Imido-Roche hervorgerufenen Wirkung mindestens 1 dcg Atropin erforderlich. Für einen isolierten longitudinalen Streifen genügt eine etwas kleinere Dosis.

Für das Histamin ist charakteristisch, daß es die Eigenschaften der longitudinalen Muskelschicht eines Katzendarmes derart verändert, daß das Calciumchlorid dann eine der normalen entgegengesetzte Reaktion auslöst. Von Calciumsalzen ist es allgemein bekannt, daß sie eine Erschlaffung des Darmes

erzeugen. Calciumchlorid bewirkt in einer Dosis von 1 dcg auf 100 ccm Lösung regelmäßig das Sinken des Tonus und Schwinden der Peristaltik eines isolierten longitudinalen Darmstreifens. An einem isolierten zirkularen Streifen beobachteten wir in unseren Versuchen konstant eine bedeutende Muskelreizung. Zirkuläre Muskeln reagieren mit Reizzuständen. Ein dem Calcium in seiner Reizwirkung auf die Zirkularschicht gleichwertiger Antagonist ist nur das Papaverin. Calciumionen wirken verschiedenartig auf zwei verschiedene Muskelschichten. Die durch Calciumsalze verursachte Obstipation ist zum Teil auf die federkielartige Verengung und longitudinale Darmerschlaffung zurückzuführen. Eine ähnliche Obstipationsform beschreibt Pal am Dickdarm nach Opium.

Wie gesagt, verursacht Calciumchlorid die Erschlaffung der Longitudinalschicht. Wenn aber eine Reizung der Muskelschicht durch Histamin vorausgegangen ist, wirkt das Calciumchlorid in einer Reihe von Fällen umgekehrt. Es tritt eine Umkehrung der Calciumreaktion ein, die folgendermaßen demonstriert werden kann: Der Tonus des durch Histamin excitierten Darmes wird entweder durch Atropin (1 dcg) oder Magnesiumchlorid (0,05 g auf 100 ccm) herabgesetzt. Applizieren wir nun 0,05 bis 0,1 g Calciumchlorid, so stellt sich eine deutliche Reizung des Darmes sowie die Peristaltik ein. Das Muskelexcitans hat den Charakter der Longitudinalmuskelschicht derart abgeändert, daß dieselbe wie eine zirkuläre Schicht reagiert. Die früheren Synergisten (Ca und Mg) werden zu Antagonisten.

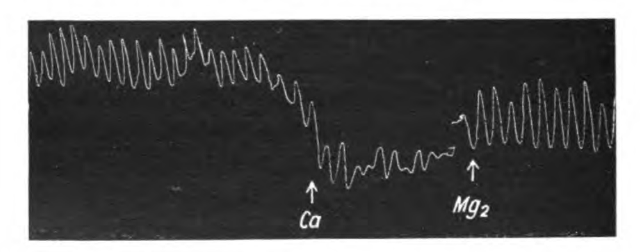


Fig. 1. Calciumreaktionsumkehr, nach vorausgegangener Reizung durch 1 ccm Hormonal. (Der erste Teil der Kurve weggeschnitten.)

Die Umkehrung der Calciumreaktion hängt nur von der gesteigerten Reizbarkeit des Muskels ab — deshalb darf eine erschlaffte Darmschlinge nicht zum Experimente genommen

werden; am besten eignet sich der Darm einer jungen oder trächtigen Katze. Auch der der Applikation des Calciumchlorids vorangehende depressorische Faktor muß so dosiert werden, daß er die excitierende Wirkung des Histamins nicht stört. Seine Aufgabe ist es nur, den Tonus einigermaßen herabzusetzen. Benützt man 1 dcg Magnesiumchlorid, so entsteht eine Depression des Darmes, die durch Calcium nur noch vergrößert wird — es zeigt sich jedoch oft eine vorübergehende intensive Darmreizung.

Bei Anwendung von Alkaloiden der Muscaringruppe konnte ich mich von keiner Umkehrung der Calciumreaktion überzeugen. Die Irritierung des Darmes zeigte sich jedoch darin, daß nach einer gewissen Depressionsdauer sich die Peristaltik regelte. Auch nach Strophanthin stellt sich die Calciumreizung unvollkommen ein und erscheint nur vorüber-

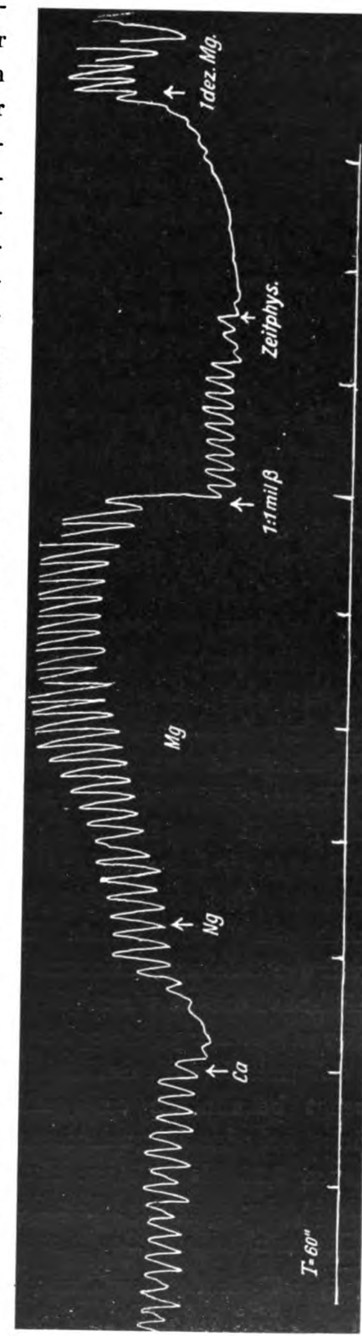


Fig. 2. Katze während der Lactation, der Darm sehr irritabel. Die potenzierte Wirkung von Pilocarpin + Physostigmin überwindet einigermaßen die Wirkung von 1 dcg $MgCl_2$. Man kann jedoch durchaus diese Wirkung mit jener von Histamin (β) (1 : 1000000) nicht vergleichen. Umkehr der Calciumreaktion.

gehend, wahrscheinlich aus dem Grunde, weil das Strophanthin kein reines Muskelexcitans ist, da es schon in einer etwas größeren Dosis den Muskel hemmt.

Im Verhältnisse zu dem Adrenalin steht das Histamin (0,15 Ampulle Imido-Roche) in fast derselben Reihe wie das Pilocarpin und Physostigmin (Dos. āā 1 cg auf 100 ccm).

Fassen wir also zusammen, worin sich die charakteristische Wirkung des Histamins auf den Katzendarm äußert, so sehen wir, daß es sich von den Alkaloiden der Muscaringruppe erstens durch seine weit intensivere Wirkung unterscheidet (in dieser Hinsicht nähert es sich dem Strophanthin — $^1/_{10}$ mg auf 100 ccm). Von beiden Gruppen unterscheidet es sich dadurch, daß es die hemmende Wirkung des Magnesiumchlorids leicht paralysiert und daß es unter günstigen Bedingungen die Umkehrung der Calciumreaktion verursacht.

Nachdem die Wirkung des Histamins auf die Darmschlinge festgestellt worden war, verglichen wir die Reaktion einiger Arzneien mit der Reaktion von 0,15 Ampulle Imido-Roche. Bei diesem Verfahren wurden gleichgroße Darmausschnitte gemacht und dafür gesorgt, daß die normale Peristaltik beider Darmschlingen gleich sei.

Zur Prüfung benutzten wir Hormonal. Das zur intravenösen Injektion bestimmte Handelspräparat enthält 0,4$^0/_0$ Trikresol. Dieses wirkt, wie Weiland[1]) angibt, sehr störend auf isolierte Darmschlingen. Ich applizierte 1 ccm Hormonal auf 100 ccm Lösung; die Darmschlinge reagierte stets prompt. Dem Magnesiumchlorid und dem Atropin gegenüber präsentierte es sich grundsätzlich gleich wie Histamin. Es ruft die für das Histamin charakteristische Calciumreaktionumkehr hervor. Durch die biologische Methode konnten wir uns überzeugen, daß das Hormonal einen Stoff von gleicher physiologischer Wirkung enthält. Dieser Umstand dokumentiert die Gefährlichkeit des Hormonals. Histamin erzeugt bekanntlich eine gefährliche Blutdrucksenkung; ebenso sinkt bei den Versuchstieren der Blutdruck nach der Injektion von 0,10 bis 0,15 ccm Hormonal pro Kilogramm bis auf $^1/_3$ bis $^1/_4$ der ursprünglichen Höhe. Es handelt sich nicht um das Histamin selbst. Das Hormonal gibt die Biuret- und

[1]) Walter Weiland, Zur Kenntnis der Entstehung der Darmbewegungen. Arch. f. d. ges. Physiol. **146**.

die Millonsche Reaktion, welch letztere durch Beimischungen verursacht ist. Das Histamin gibt die Biuretreaktion nicht. Hormonal gibt mit Pikrinsäure und Platinchlorid keinen Niederschlag (Weiland), Histamin wird durch beide ausgefällt (Ackermann).

Glycylhistamin verriet ebenfalls seine chemische Verwandtschaft mit Histamin. Seine Wirkung ist qualitativ dieselbe, dennoch aber sichtlich schwächer als die des Histamins. Die Ursache dieser geschwächten Wirkung liegt in der Verbindung mit Glykokoll. Es zeigte sich nämlich, daß Glykolesterchlorhydrat in Dosen von 1 bis 2 dcg auf 100 ccm Lösung zur Tonussenkung eines Katzen- wie eines Kaninchendarmes führt. Die Depression stellt sich prompt ein und läßt sich leicht mit 1 cg Pilocarpin beseitigen. Bei einem Kätzchendarm sinkt der Tonus, die Peristaltik erschlafft und nach Zugabe von 5 cg Atropin zeigt der Darm sichtlichen Reizzustand. Es handelt sich dabei um sympathikotrope Wirkung des Glykolester. Errico[1]) bemerkte, daß das Natriumglykokoll (1 cg auf 100 ccm Ringer-Lösung appliziert) „ein rasches Nachlassen der Spannung des Präparates zur Folge hat, während die Contractionen schwächer und weniger häufig werden".

Die Hemmungswirkung dieses Salzes kann man als auch teilweise von der Anwesenheit einer sympathikotropen Aminosäure ableiten.

Das zweite Amin, dessen Existenz durch die Darmreaktion nachweisbar ist, ist das Tyramin (Paraoxyphenyläthylamin). Zum Nachweis von Tyramin mußten wir uns dreier Darmschlingen bedienen, und zwar derjenigen eines Kaninchens, einer Katze und eines Hundes. Guggenheim gibt an, daß schon $^1/_{10}$ mg Tyramin eine bedeutende Hemmung des Katzendarmes hervorruft, der Kaninchendarm dagegen wird gereizt. A. Kuyer und A. Wijsenbech[2]) beschreiben gleichfalls die Reizwirkung des Tyramins auf dem Kaninchendarm.

Bei unseren Versuchen zeigte es sich, daß 1 cg Tyramin (auf 100 ccm Lösung) in dem Kaninchendarm konstant nur Reizzustände zur Folge hat, bei einer Katze zeigt sich zuerst

---

[1]) D. G. D. Errico, Wirkung der Galle und der Gallensäurensalze auf den Tonus usw. Zeitschr. f. Biol. 54.

[2]) A. Kuyer und J. A. Wijsenbech, Über Entgiftungserregung und Entgiftungshemmung. Arch. f. d. ges. Physiol. 154.

vorübergehende Reizung (größer bei jungen und bei trächtigen Katzen), dann aber eine länger dauernde Hemmung.

An einem Hundedarme (ich verfügte nur über junge Hunde) machte sich eine Tonussenkung ohne vorangehende Reizung bemerkbar. Der Katzen- und Hundedarm reagiert auf Tyramin ähnlich wie auf Atropin. Nach Atropin zeigt der Hundedarm fast nie eine Initialreizung, der Katzendarm ist jedoch fast immer vorher irritiert.

Die Hemmungswirkung manifestiert sich deutlicher auf einem isolierten longitudinalen Streifen. Dieser Einfluß auf die Peristaltik einer frischen Darmschlinge war manchmal kaum sichtbar. Und er schwindet gänzlich, wenn eine Histamindarmreizung vorausging, ja schon nach Phenyllactylamin ist er wenig wirksam. Seine ganze Hemmungswirkung kann das Tyramin nur an einem irgendwie geschwächten Darme entfalten. An einem ermüdeten Präparate wird es sogar zu einem starken Antagonisten des Hystamins.

Nach Tyramin schwindet die Peristaltik sofort, und zum Paralysieren dieser Hemmungskraft sind immer größere und größere Histamindosen erforderlich, bis endlich auch das Histamin versagt und das Strophanthin als einziger Regulator des Tonus und der Peristaltik dasteht.

Den vorübergehenden, durch Tyramin verursachten Reizzustand des Katzendarmes kann man sehr anschaulich an einem durch Adrenalin hypotonisierten Darm (0,1 mg Adrenalin auf 100 ccm) demonstrieren.

In der Tyraminwirkung auf drei verschiedenartige Därme haben wir ein genügendes Hilfsmittel, die Anwesenheit von Tyramin in einem zu prüfenden Stoffe sicherzustellen. Auf diese Weise wäre es möglich, den Beweis zu liefern, ob im Secacornin-Roche tatsächlich — wie Niculescu[1]) annimmt, Paraoxyphenyläthylamin vorkommt.

Des von der Fabrik uns zu Versuchszwecken zur Verfügung gestellten Präparates konnten wir uns wegen der unvorteilhaften Lösungsflüssigkeit nicht bedienen.

---

[1]) Petre Niculescu, Über die Beziehungen der physiologischen Wirkungen von Hypophysenextrakt usw. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. **15**, Heft 1, S. 6.

Der Darm, ein Organ mit zweifacher Innervation, reagiert sehr empfindlich auf autonome und sympathikotrope Faktoren und erscheint deshalb zur biologischen Bestimmung verschiedener Substanzen besser als irgendein anderes Organ geeignet. Ein kleines Beispiel erläutert das Gesagte:

Meirowský[1]) konstatierte, daß ein auf $^1/_3$ eingedickter, wässeriger, alkoholischer oder Toluol-Extrakt der Haut die Froschpupille wie das Adrenalin erweitert. Es handelt sich aber nicht um Adrenalin, weil dieser Extrakt die charakteristische Eisenchloridreaktion nicht gibt, ebenso konnte Trendelenburg keine vasoconstrictorische Wirkung auf die Gefäße des Frosches feststellen.

Ich habe die Wirkung der Extrakte auf die überlebenden Katzendarmschlingen studiert. Die Haut eines Kaninchens oder Hundes wurde rasiert, fein zerschnitten und mittels physiologischer Lösung 1 : 1 extrahiert. Nach zweistündiger Extraktion wurde eine opalescierende Flüssigkeit alkalischer Reaktion gewonnen. 2 ccm des filtrierten Extraktes zu 100 ccm des Bades gegeben, rufen bei dem Katzen- und Hundedarm eine Steigerung und Regelung der Peristaltik hervor. Durch Kochen wird die Wirksamkeit der Substanzen nur wenig beeinträchtigt.

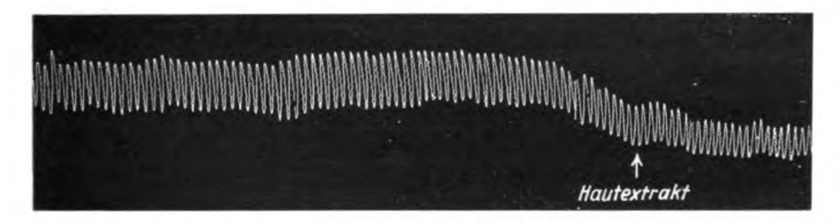


Fig. 3. Der Reizeinfluß eines frischen Kaninchenhautextraktes.

Nach 12 bis 24 stündiger Extrahierung mittels destillierten Wassers zeigte zwar der gewonnene, nicht eingedickte Extrakt noch seinen excitierenden Einfluß auf den Darm, aber in weit kleinerem Maße als der frische Extrakt.

Der auf $^1/_4$ eingedickte Extrakt (durch Destillation bei niedrigem Drucke) einer mit Sand verriebenen Haut verursachte

[1]) E. Meirowský, Über einen biologischen Nachweis der Wirkung von Hautextrakten. Münch. med. Wochenschr. **1912**.

eine ganz geringe Mydriase des Froschauges, an dem Darme dagegen ist der sympathikotrope Hemmungscharakter dieses Extraktes recht deutlich und manifest.

Die Peristaltik erschlafft nach 1 bis 2 ccm — dabei zeigt sich manchmal während des Erschlaffungszustandes eine Reihe hoher, regelmäßiger Contractionen.

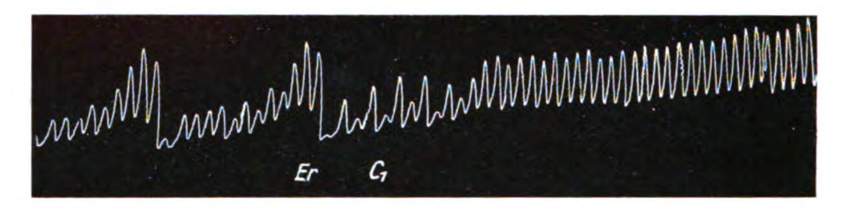


Fig. 4.

Die Wirkung des Pilocarpins ist nicht geschwächt. Nach diesen Versuchen kann man annehmen, daß der Extrakt sichtlich zwei verschiedene Substanzen enthält, von denen die erste das autonome und die zweite das sympathische System excitiert. Die erste Substanz läßt sich viel leichter extrahieren. Die periodische Erschlaffung und Wiederbelebung ist auf die antagonistische Wirkung beider Substanzen zurückzuführen; eine ähnliche Erscheinung beobachtete ich nach Applikation von 2 dcg Glykokollesterchlorhydrat auf den durch das Pilocarpin gereizten Darm.

Der Darm registriert die Anwesenhsit des sympathikotropen Faktors viel früher und empfindlicher als die Froschpupille.

Die reizende Substanz erinnert an die von Weiland aus dem Darme isolierte Substanz. Der sympathikotrope Stoff ist vielleicht ein Sensibilisator für die Adrenalinwirkung analog dem Hypophysenextrakte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß er mit Adrenalin in einem genetischen Zusammenhange steht.

Zusammenfassung.

1. Das Histamin ist die wirksamste Wiederbelebungssubstanz für den Darm, ein starker Antagonist des Chloroforms. Es beseitigt leicht die Wirkung des Magnesiumchlorids.

2. Calciumchlorid erzeugt an der zirkulären Muskelschicht des Katzendarmes einen Reizzustand, an der longitudinalen eine Erschlaffung.

3. Ein durch das Histamin excitierter Darm reagiert auf Calcium mit Reizzustand, auf Magnesium mit Hemmung.

4. Hormonal erinnert in mancher Hinsicht an Histamin; es verursacht ebenfalls die Calciumreaktionsumkehr. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um ein und dasselbe physiologische Agens.

5. Glycylhistamin wirkt schwächer als Histamin, was auf die Anwesenheit des Glykokolls als sympathischen Reizstoffes zurückzuführen ist.

6. Tyramin reizt den Kaninchendarm, den Katzendarm bringt es zuerst in einen Reiz-, dann in einen Hemmungszustand, beim Hund dagegen entfaltet es nur seine hemmende Wirkung.

7. Hautextrakte enthalten zwei antagonistisch wirkende Substanzen. Das Darmexcitans des Hautextraktes ist leicht zu isolieren und widersteht dem Kochen.

Einfluß der Invertase auf die Verwertung des Rohrzuckers und des Traubenzuckers im tierischen Organismus.

Von

S. La Franca.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der K. Universität in Neapel.)

(Eingegangen am 14. Juli 1914.)

Wie wohl bekannt ist, hängt die Verwertung der Kohlenhydrate im Organismus stets von der Anwesenheit verschiedenartiger Fermente ab, die die höheren Polymere spalten und die einfacheren Verbindungen polymerisieren oder oxydieren. Was von den löslichen Kohlenhydraten entweder wegen seiner Beschaffenheit oder wegen des Überschusses der im Blute befindlichen Menge dieser Stoffe nicht verwendet werden kann, wird mit dem Harn ausgeschieden.

Der Rohrzucker wird als solcher im allgemeinen von den höheren Organismen nicht verwertet: Er wird nämlich im Magendarmrohr invertiert, mit Hilfe sowohl der Salzsäure des Magens als auch spezifischer Fermente vom Typus der Invertase, die von den mit dem Verdauungsapparat verbundenen Drüsen oder von im Darmrohr wohnenden Bakterien produziert werden [Bourquelot[1]), Lisbonne[2])].

Gayon und Dastre[3]) haben behauptet, daß sich in der Leber verschiedener Säugetiere eine Invertase vorfinde, aber gegen diese Schlußfolgerung sprechen viele unter der Leitung Albinis[4]) durchgeführte Kontrollexperimente. Weinland[5])

---

1) Bourquelot, Compt. rend. Soc. Biol. **1910**. Paris, 11 juin.

2) Lisbonne, ibid.

3) Dastre, Arch. de Phys. norm. et path. **1887**, Nr. 7 bis 8.

4) Vgl. Jappelli und D'Errico.

5) Weinland, Monatsschr. f. Psychiatrie und Neurologie **47**, 1905.

nimmt an, das das Darmrohr das einzige Organ sei, das invertierendes Ferment enthalte.

Jappelli und D'Errico[1]) schlossen aus einer Reihe von Untersuchungen unter anderem, daß der einzige Sitz der Invertase der Verdauungskanal sei und daß, weil der direkt in den Kreislauf eingeführte Rohrzucker nie in einer der Einfuhr gleichen Menge durch den Harn ausgeschieden wird, der nicht ausgeschiedene Teil ins Lumen des Verdauungskanals gelange, indem er, außer durch die Darmschleimhaut, auch durch den Speichel ausgeschieden und mit letzterem verschluckt werde, als ob er eingeführt worden sei.

Das Blut übt nicht nur keine invertierende Wirkung aus, sondern es hindert die Wirkung des invertierenden Fermentes, wenn dieses künstlich hinzugesetzt wird.

Bei den im folgenden besprochenen Experimenten wollte ich untersuchen, wie sich die Verwendung des Rohrzuckers und des Traubenzuckers unter der Einwirkung eines dem tierischen Organismus fremden Enzyms verhält, wie es dasjenige ist, das sich aus den Fermenten des Bieres extrahieren läßt.

Meine Experimente sind in drei Reihen eingeteilt:

A. Experimente über die Wirkung der Invertase hinsichtlich der Verwendung des in den Kreislauf eingeführten Rohrzuckers;

B. Experimente über die Wirkung desselben Enzyms auf die Verwendung des ebenfalls auf parenteralem Wege eingeführten Traubenzuckers;

C, D, E. Experimente über den Einfluß, den die Invertase auf die verschiedenen Arten von Glucosurien (Phlorizin-, Adrenalin-, Pankreasglucosurie) ausüben kann.

Untersuchungsmethode.

Die Invertase wurde nach der von Henri[2]) empfohlenen Methode hergestellt: frische Bierhefe und destilliertes Wasser in gleichen Teilen, es wurden 5 ccm Chloroform zugesetzt, das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 37° im Thermostaten ge-

---

[1]) Jappelli e D'Errico, Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli, 1903 bis 1904.

[2]) Henri, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 1901.

halten, dann filtriert, die Invertase mit Alkohol gefällt, auf dem Filter gesammelt und im Vakuum getrocknet.

Nach Herstellung der Invertase wurde ihre Aktivität erprobt, indem ich sie auf eine bestimmte Menge Rohrzucker einwirken ließ; dann löste ich jedesmal die gewünschte Menge in physiologischer Flüssigkeit auf und injizierte dem Tiere die Lösung mittels einer 10 ccm fassenden gewöhnlichen Spritze nach vorausgegangener Sterilisierung der letzteren.

Die Bestimmung des Rohrzuckers und des Traubenzuckers in den Einspritzungsflüssigkeiten oder in dem vom Tiere entleerten Harn wurde vermittels des Laurentschen Polarimeters (großes Modell) vorgenommen.

A. Einfluß der Invertase auf den in den Kreislauf eingeführten Rohrzucker.

Für diese Reihe von Experimenten verwendete ich Hunde von mittlerer Größe, die 5 Tage vor der Zeit des Experimentes und während der letzteren einer konstanten Diät unterzogen wurden; der Harn wurde zu wiederholten Malen analysiert, so daß auf absolute Weise Veränderungen des Stoffwechsels oder eventuell der Nieren ausgeschlossen werden konnten. Der Rohrzucker in der zu injizierenden Flüssigkeit wurde jedesmal vorher quantitativ bestimmt. Der Harn wurde mittels Katheterisierens erhalten. Ich bringe die Resultate in der folgenden Tabelle (I).

Aus den in der nebenstehenden Tabelle angeführten Werten ergibt sich, daß der in den Kreislauf eingeführte Rohrzucker zum größten Teil als solcher durch den Harn ausgeschieden wird; nur ein kleiner Teil wird — wie schon bei den weiter oben besprochenen Experimenten konstatiert worden war, vernichtet oder zurückgehalten. In der Tat wurden von injizierten 9,42 g 8,96 g im Harn angetroffen, also ein Unterschied von 0,46 g, die vernichtet oder zurückgehalten wurden.

Injiziert man dagegen Invertaselösungen sowohl vorher als gleichzeitig, so nimmt die Menge des ausgeschiedenen Rohrzuckers im Verhältnis zur Menge des injizierten Fermentes ab. Es werden nämlich mit 10 cg Invertase 7,12 g ausgeschieden, mit 15 cg werden von 9,10 eingeführten 6,47 g ausgeschieden; mit 40 cg dagegen findet eine Ausscheidung von 1,18 g von

9,40 g statt, also eine Verwendung von 8,24 g; mit 50 cg wurden von 9,40 g 0,34 g ausgeschieden, mit Invertierung von 9,08 g.

Tabelle I.

Experimente (ausgeführt im April 1911)	Menge des injizierten Rohrzuckers g	Zeit der Beobachtung Std.	Menge des Harns ccm	P	Menge des ausgeschiedenen Rohrzuckers g	Menge des in 24 Stunden ausgeschiedenen Rohrzuckers g	Unterschied zwischen der injizierten und der ausgeschiedenen Rohrzuckermenge g
1. Injektion von 100 ccm Rohrzuzkerlösung ins Peritoneum (Kontrollexperiment).	9,42	3 6 9 24	40 45 52 292	$19^h\ 44'$ $5^h\ 50'$ $1^h\ 00'$ $0^h\ 20'$	5,90 1,95 0,39 0,72	8,96	0,46
2. Injektion von 10 cg Invertase in Lösung ins Peritoneum und 1 Std. 20 Min. von 100 ccm Rohrzucker, ebenfalls ins Peritoneum.	9,41	3 6 9 24	56 50 40 172	$6^h\ 50'$ $9^h\ 20'$ $2^h\ 00'$ $0^h\ 24'$	2,85 3,49 0,60 0,28	7,12	2,30
3. Injektion von 15 cg Invertase in Lösung in eine oberflächliche Vene. Nach 24 Std. Injektion v. 100 ccm Rohrzuckerlösung.	9,10	3 6 9 24	40 30 53 364	$10^h\ 56'$ $10^h\ 20'$ $2^h\ 16'$ $0^h\ 00'$	3,26 2,32 0,89 0,00		
4. Injektion von 40 cg Invertase in Lösung ins Peritoneum; nach 24 Std. Injektion von 100 ccm Rohrzuckerlösung.	9,40	3 6 9 24	30 50 20 280	$1^h\ 30'$ $1^h\ 30'$ $1^h\ 30'$ $0^h\ 00'$	0,36 0,56 0,26 0,00	1,18	8,24
5. Injektion von 50 cg Invertase subcutan, und nach 1 Stunde 15 Min. Injektion von 100 ccm Rohrzucker.	9,40	3 6 9 24	40 32 30 380	$0^h\ 30'$ $0^h\ 30'$ $0^h\ 30'$ $0^h\ 00'$	0,14 0,10 0,10 0,00	0,34	9,08
6. Injektion von 100 ccm Rohrzuckerlösung ins Peritoneum, bei demselben Tier wie im 5. Experiment.	9,40	9 16	79 140	$9^h\ 22'$ $0^h\ 00'$	5,53 0,00	5,53	3,87

Der Einfluß des Fermentes dauert im Organismus eine gewisse Zeit hindurch fort. Es findet nämlich 2 Tage nach Einspritzung der Invertase eine Ausscheidung von 5,33 g der eingeführten 9,40 g statt, also sind 3,87 g invertiert worden.

B. Einfluß der Invertase auf die Verwendung des Traubenzuckers.

Bei dieser Reihe von Untersuchungen verwendete ich Hunde von kleinen Dimensionen, die während einer Zeit von 15 bis 20 Tagen einer kohlenhydratreichen Diät unter-

Tabelle II.

Experimente (ausgeführt im April 1911)	Menge des injizierten Traubenzuckers g	Zeit der Beobachtung Std.	Menge des Harns cbm	P	Menge des ausgeschiedenen Traubenzuckers g	Gesamtmenge des ausgeschiedenen Traubenzuckers g	Menge des beobachteten Traubenzuckers g
1. Injektion von 200 ccm Traubenzuckerlösung ins Peritoneum (Kontrollexperiment).	37,28	8 24	172 320	$6^h\ 32'$ $2^h\ 30'$	10,30 7,58	17,88	18,40
2. Injektion von 20 cg Invertase in Lösung und nach 1 Stunde 200 ccm Traubenzuckerlösung.	37,28	8 24	156 385	$0^h\ 00'$ $0^h\ 00'$	— —	— —	37,28
3. Injektion von 20 cg Invertase; nach 1 Std. 100 ccm Traubenzuckerlösung ins Peritoneum und 100 ccm in eine oberflächliche Vene.	37,28	8 24	136 415	$0^h\ 14'$ $0^h\ 00'$	0,028 —	0,028	36,26
4. Injektion von 50 cg Invertase in Lösung subcutan, und von 200 ccm Traubenzuckerlösung ins Peritoneum sowie 100 ccm in eine oberflächliche Vene.	55,92	8 24	195 512	$0^h\ 00'$ $0^h\ 00'$	— —	— —	55,92
5. Injektion von 200 ccm Traubenzucker bei dem Tiere, das zum 4. Experiment gedient hat, nach 2 Tagen ausgeführt.	37,28	18	260	$0^h\ 00'$	—	—	37,28
6. Bei demselben Tiere wird nach 8 Tagen eine Injektion von 200 ccm Traubenzucker gemacht.	37,28	18 24	312 95	$0^h\ 36'$ $0^h\ 00'$	1,76 —	1,76	35,52

zogen worden waren. Ihre Nahrung bestand in Brot, Stärke, Traubenzucker und Fett. Das Experiment wurde begonnen, wenn bei subcutaner oder intravenöser Injektion des Traubenzuckers dieser im Harn erschien.

Aus den in der vorangehenden Tabelle (II) angegebenen Werten ergibt sich, daß die Einführung von Invertase in den Kreislauf die Verwendung des ebenfalls zirkulierenden Traubenzuckers beschleunigt und erhöht.

So zeigte der Harn, während ich bei Injektion von 37,28 g Traubenzucker ins Peritoneum 17,88 g im Harn fand, wenn ich dieselbe Injektion wiederholte, eine Stunde nach Einspritzung von 20 cg Invertase keine Spuren von Traubenzucker.

Beim 3. Experiment, bei dem 1 Stunde nach Injektion von 20 cg Invertase 37,28 g Traubenzucker eingeführt wurden, traf ich im Harn der ersten 8 Stunden 0,029 g Traubenzucker an. Beim 4. Experiment dagegen, bei dem 50 cg Invertase injiziert wurden, indem ich auch in die Vene 55,92 g Traubenzucker injizierte, wurde keine Spur davon im Harn gefunden. Diesem selben Tiere wurden 2 Tage später 37,28 g Traubenzucker eingespritzt, ohne daß eine Spur davon im Harn erschien, und nach 8 Tagen injizierte ich weitere 37,28 g, von denen in den ersten 18 Stunden nur 1,76 g ausgeschieden wurden.

Diese Resultate lassen darauf schließen, daß, wenigstens in den ersten Tagen, die Verwendung des Traubenzuckers im Verhältnis zur Menge der zirkulierenden Invertase steht, und daß die Wirkung der Invertase eine bestimmte Zeit hindurch andauert und dann allmählich immer mehr abnimmt.

C. Einfluß der Invertase auf die Phlorizinglucosurie.

Bei dieser Reihe von Experimenten verwendete ich Hunde von mittlerer Größe. Während der Experimente, denen es unterzogen wurde, hielt ich das Tier immer in derselben Umgebung und bei derselben Temperatur und ernährte es mit derselben täglichen Milchmenge. Das Phlorizin wurde stets subcutan in Natriumcarbonatlösung, die Invertase gewöhnlich in physiologischer NaCl-Lösung gelöst, injiziert.

Die erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle (III) angegeben.

Tabelle III.

(Experimente, im April 1911 ausgeführt).

Nummern des Experimentes	Gewicht des Tieres kg	Menge des injizierten Phlorizins cg	Menge der injizierten Invertase cg	Tage der Beobachtung	Harnmenge in 24 Stunden ccm	P	Menge des in 24 Stunden ausgeschiedenen Traubenzuckers g	Bemerkungen
1	6,150	50	—	1.	420	$1^h\,49'$	7,20	
—	—	—	—	2.	360	—	Spuren	
2	—	50	35	1.	342	$2^h\,23'$	7,69	Derselbe Hund wie beim 1. Experiment; nach 5 Tagen.
—	—	—	—	2.	248	$0^h\,00'$	0,00	
3	—	50	—	1.	280	$2^h\,08'$	5,65	Id. 2 Tage nach dem vorhergehenden Experiment.
—	—	—	—	2.	325	$0^h\,12'$	0,61	
4	5,680	50	—	1.	320	$3^h\,58'$	12,01	
—	—	—	—	2.	295	$1^h\,01'$	2,84	
5	—	—	(1)	1.	310	$2^h\,46'$	8,11	
—	—	(2)	—	2.	280	$4^h\,26'$	11,76	
—	—	—	—	3.	265	$4^h\,11'$	10,50	

(1) — (2) — Vier Tage hintereinander wurden Injektionen von 15, 20, 40, 50 cg Invertase vorgenommen. Am 5., 6. und 7. Tage wurden täglich Injektionen von 50 cg Phlorizin gemacht. An diesen Tagen wurden die in der Tabelle angeführten Bestimmungen ausgeführt.

Aus den in der vorstehenden Tabelle angeführten Werten ergibt sich, daß die Phlorizinglucosurie nicht oder nur auf sehr leichte Weise durch die Einführung der Invertase in den Kreislauf beeinflußt wird, sowohl wenn man letzteres injiziert, als auch wenn man das Tier durch eine Reihe von vorausgehenden Injektionen vorbereitet. Die Schwankungen, die in den Werten, die den während der verschiedenen Tage abgegebenen Traubenzucker betreffen, beobachtet werden, können einem Einflusse des Fermentes nicht zugeschrieben werden, weil sie, wie aus den von den zahlreichen Experimentatoren erhaltenen Resultaten bekannt ist, bei Behandlung mit Phlorizin stets eintreten.

D. Einfluß der Invertase auf die Adrenalinglucosurie.

Bei dieser Reihe von Experimenten verwendete ich Hunde von kleinen Dimensionen. Das gebrauchte Adrenalin war das von Parke und Davis in 1‰ Lösung. Die Injektionen wurden intramuskulär oder subcutan gemacht.

Tabelle IV.
(Experimente, im Januar 1912 ausgeführt).

Nummern des Experimentes	Gewicht des Tieres kg	Menge der injizierten Adrenalinlösung cg	Menge der injizierten Invertase cg	Tage der Beobachtung	Harnmenge in 24 Stunden ccm	P	Menge des in 24 Stunden ausgeschiedenen Traubenzuckers g	Bemerkungen
1	4,100	4	—	1.	92	4h 20′	3,51	
—	—	—	—	2.	324	0h 00′	0,00	
—	—	—	—	3.	292	0h 00′	0,00	Kontrollexperiment
2	—	4	25	4.	108	0h 00′	0,00	Derselbe Hund wurde bei allen 5 Experimenten verwendet.
—	—	—	—	5.	265	0h 00′	0,00	
3	—	4	—	6.	180	2h 30′	4,20	
—	—	—	—	7.	220	0h 00′	0,00	
4	—	4	30	8.	320	0h 00′	0,00	
—	—	—	—	9.	240	0h 00′	0,00	
5	—	4	—	10.	90	3h 16′	2,78	
—	—	—	—	11.	100	0h 20′	0,31	

Aus den in der vorstehenden Tabelle (IV) angegebenen Werten ergibt sich, daß, während beim ersten Experiment eine Injektion von 4 ccm 1 $^0/_{00}$igen Adrenalins beim Hunde Ausscheidung von 3,51 g Traubenzucker durch den Harn hervorruft, keine Spur davon sich vorfindet, wenn man derselben Injektion noch eine von 25 cg Invertase vorausschickt. Eine neue Adrenalininjektion jedoch, die nach 24 Stunden gemacht wird, läßt die Glucosurie wiedererscheinen.

Die an einem zweiten Tiere ausgeführten Experimente ergaben übereinstimmende Resultate.

E. Einfluß der Invertase auf den Pankreasdiabetes.

Bei den Experimenten dieser Reihe verwendete ich ziemlich kleine Hunde. Nach der Operation (Pankreasexstirpation) mußten die Tiere 24 Stunden lang hungern und vom zweitfolgenden Tage ab bei Milchdiät in (mit 100 bis 150 g Rohrzucker) konstanter Menge gehalten werden.

Die erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle (V) verzeichnet, auf der die Experimenttage mit dem auf den Operationstag folgenden Tage beginnen.

Aus den in der nachstehenden Tabelle (V) zusammengestellten Werten ergibt sich, daß, während in den ersten 24 Stunden sofort nach der Pankreasexstirpation der vom ersten Hunde

ausgeschiedene Traubenzucker 11,62 g betrug, dieser nach einer Einspritzung von 10 cg Invertase auf 13,83 g stieg; nach der Einführung von 50 cg Ferment in den Kreislauf stieg er auf 6,39 g; als dieselbe Dosis am folgenden Tage wieder gegeben wurde, wurden nur 4 g Traubenzucker angetroffen. Am 5. Tage, an dem die Behandlung mit dem Ferment eingestellt wurde, stieg er auf 10,45 g.

Tabelle V.

Experimente (ausgeführt im März 1912)	Tage des Experimentes	Menge der injizierten Invertase cg	Menge des in 24 Stunden entleerten Harns ccm	P	Menge des in 24 Stunden ausgeschiedenen Traubenzuckers g	Bemerkungen
1. Männlicher Hund. Gewicht 6,280 kg. Vom 2. Tage der Operation ab bei konstanter Milchdiät und Rohrzuckergehalten. Am 6. Tage verendete der Hund. Bei der Autopsie wurde diffuse Nekrose des Duodenums gefunden.	1. 2. 3. 4 5. 6.	0 10 50 50 0 0	240 225 300 220 200 100	5^h 04′ 6^h 30′ 2^h 15′ 1^h 56′ 5^h 31′ 5^h 00′	11,62 13,83 6,39 4,00 10,45 4,74	
2. Männlicher Hund. Gewicht 4,900 kg. Vom 2. Tage nach der Operation bei Milchdiät und Rohrzucker in konstanter Menge gehalten. Am 7. Tage verendete das Tier und bei der Autopsie wurde diffuse Nekrose des Duodenums angetroffen.	1. 2. 3. 4. 5 6. 7.	0 10 60 0 0 10	150 200 154 221 260 293	8^h 25′ 9^h 16′ 2^h 21′ 5^h 58′ 6^h 00′ 7^h 56′	11,73 17,56 3,41 12,49 14,77 22,00	 Blutiger, mit Erbrochenem gemischter Harn.
3. (Experiment, ausgeführt im Mai 1914). Männlicher Hund. Gewicht 8,400 kg. Milchdiät mit Rohrzucker. Der Hund wurde am 19. operiert und vom 21. an wurden die Harnbestimmungen angefangen.	1. 2. 3.	40 50 —	1150 560 310	2^h 22′ 2^h 06′ 1^h 54′	25,76 10,97 5,58	 Der Hund stirbt.

So verhielt es sich auch beim zweiten Experiment. Während der in den 24 Stunden nach der Operation ausgeschiedene Traubenzucker 11,73 g betrug, stieg er mit der Injektion von 10 cg Invertase auf 17,56 g, infolge Einführung von 60 cg Ferment sank er sofort auf 3,41 g und stieg wieder auf 12,49 bzw. 14,77 g an den beiden folgenden Tagen, an denen die Behandlung mit dem Enzym eingestellt wurde; endlich bewirkte die Injektion von 10 cg Ferment, daß die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Traubenzuckers wieder auf 22 g stieg.

Aus dem dritten Experiment sieht man, daß die durch den Harn in 24 Stunden ausgeschiedene Zuckermenge nach der Invertaseeinspritzung von dem Werte von 25,76 g auf den Wert von 10,97 sank.

Die bei den oben beschriebenen Experimenten erhaltenen Resultate lassen sich auf folgende Weise zusammenfassen:

1. Werden einem Hunde beträchtliche Mengen von Rohrzucker und eine genügende Menge von Invertase injiziert, so erscheint der Rohrzucker im Harn nur in kleinen Proportionen wieder, weil er im Blute invertiert wird; die entstehenden Monosaccharide werden ganz von dem Organismus ausgenutzt. Je nach der verwendeten Invertasemenge kann die Verwendung des Rohrzuckers größer oder geringer und auch vollständig sein.

2. Der Einfluß des Fermentes dauert im Organismus eine gewisse Zeit hindurch fort.

3. Die Invertase begünstigt auch die Verwertung der Monosaccharide. Injiziert man nämlich einem Hunde eine sehr große Menge Traubenzucker und dann eine genügende Menge Invertase, so wird die Glucosurie (die ohne das Ferment eine beträchtliche wäre) fast gleich Null.

4. Die glucosurischen Hunden injizierte Invertase modifiziert die Glucosurie auf verschiedene Weise, nämlich:

a) sie beeinflußt die Adrenalinglucosurie, indem sie entweder ihren Eintritt verhindert, oder sie zum Verschwinden bringt, wenn sie schon aufgetreten ist;

b) sie bewirkt, daß der Pankreasdiabetes abnimmt, bis er ganz aufhört, wenn die dem Tiere zugeführte Invertasedosis

groß war. Wenn die Invertasemenge gering ist, scheint die Glucosurie zuzunehmen;

c) die Phlorizinglucosurie beeinflußt sie nicht.

Diese experimentellen Resultate verdienen einige kurze Überlegungen.

Die Tatsache der Verwendung des Rohrzuckers nach der parenteralen Einführung von Invertase ist eine interessante, aber nicht überraschende Erscheinung. Das Enzym wirkt auch ein, wenn es mit dem Blutserum und den Geweben des Organismus vermischt wird, und die Spaltungsprodukte des Disaccharids werden, wie es gewöhnlich geschieht, oxydiert.

Schwieriger zu erklären ist die raschere Oxydation des Traubenzuckers selbst unter der Einwirkung der Invertase, und diese Erscheinung erfordert noch weitere experimentelle Forschungen, die ich anzustellen beabsichtige.

Was den Einfluß der Invertase auf die von mir studierten Glucosurieformen anbelangt, kann ich sagen, daß bei den Formen, bei denen Hyperglykämie vorhanden ist (Adrenalin-, Pankreasglucosurie), die herabsetzende Wirkung der Invertase in Beziehung zu der eben erwähnten Erscheinung, nämlich der rascheren Oxydation des Traubenzuckers unter dem Einfluß dieses Enzyms, zu bringen ist. Was die Form der Phlorizinglucosurie betrifft, so ist eben das Fehlen der Hyperglykämie die Ursache der ausgebliebenen Wirkung des Fermentes. Man versteht wirklich sofort, in Anbetracht des pathogenetischen Mechanismus der Phlorizinglucosurie, daß die Intensität der Oxydationsvorgänge des Traubenzuckers die Filtration dieses Stoffes durch die Nieren nicht in hervorragender Weise beeinflussen kann.

Es bleibt noch ein anderer dunkler Punkt zu erklären, nämlich die Zunahme des Diabetes bei Hunden nach Pankreasexstirpation unter der Einwirkung kleiner Dosen von Invertase; in dieser Hinsicht wage ich es nicht, eine Hypothese aufzustellen, und dies um so weniger, weil ich in Anbetracht der geringen Zahl meiner Experimente nicht gewiß sagen kann, ob dies nicht eine zufällige Erscheinung ist.

Untersuchungen über die physikalische Hautwasserabgabe.

Von

A. Loewy (Berlin).

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

(Eingegangen am 9. Juli 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die dauernd strittig gewesene Frage, worauf die ununterbrochen vor sich gehende Wasserabgabe von der Haut beruht, ob und inwieweit neben der Schweißbildung eine einfache Abdunstung von Wasser durch die Oberhaut hindurch erfolgt, und ob in allen Fällen, in denen sichtbarer Schweiß nicht abgesondert wird, die Haut sich vielmehr trocken anfühlt, nur eine Wasserdampfabgabe auf physikalischem Wege stattfindet, oder auch hier die Schweißdrüsen sezernieren, und zwar so wenig, daß das sezernierte Wasser sofort verdunsten kann — alle diese Fragen konnten zum Teil eindeutig beantwortet werden, zum Teil einer Beantwortung näher gebracht werden, als ich in einer mit W. Wechselmann ausgeführten Untersuchung in der Lage war, die Wasserabgabe seitens der Haut bei drei — blutsverwandten — Individuen zu untersuchen, die an eigentümlichen ektodermalen Hemmungsbildungen litten und denen im speziellen die Schweißdrüsen und größtenteils auch die Hauttalgdrüsen fehlten[1]).

---

[1]) A. Loewy und W. Wechselmann, Zur Physiologie und Pathologie des Wasserwechsels und der Wärmeregulation seitens des Hautorgans. Virchows Arch. **206**, 79, 1911. Hier sind alle durch Abbildung erläuterten Daten über die mikroskopische Beschaffenheit der Haut angegeben; zugleich ein historischer Abriß über die Entwicklung der Anschauungen von der insensiblen Wasserabgabe der Haut.

Es ergab sich, daß diese Personen ohne Schweißdrüsen erhebliche und je nach den Versuchsbedingungen sehr wechselnde Wassermengen abgeben konnten. Das Maximum dieser Wasserabgabe, die also rein physikalisch durch Verdunstung von der Hautoberfläche erfolgen mußte, war beträchtlich; es betrug ca. **15,6** g pro Quadratmeter und Stunde, das sind etwa **600** g für die Gesamtkörperoberfläche und **24** Stunden.

Gleichzeitig unter den gleichen Versuchsbedingungen angestellte Bestimmungen an gesunden Menschen zeigten weiter, daß die Hautwasserabgabe bei diesen nicht höher lag als bei den Schweißdrüsenlosen, wenn es sich um mittlere Umgebungstemperatur und Körperruhe handelte, also um Verhältnisse, die eine gesteigerte Wärmeabgabe nicht erforderten. — Erst wenn letztere notwendig wurde, sei es durch Steigerung der Umgebungstemperatur oder durch Muskelarbeit, trat bei den Gesunden eine plötzliche rapide Vermehrung der Wasserabgabe durch einsetzende Schweißbildung ein, bei den Kranken jedoch trat dieser Effekt niemals in Erscheinung.

Da die Menge des Hautwassers, das von unseren Kranken abgegeben werden konnte, auf der Höhe lag, die auch von anderen Beobachtern an nichtschwitzenden Gesunden gefunden war, da bei den **10** von mir untersuchten Gesunden kein Zeichen insensibler Schweißbildung zu erkennen war — die Angabe Cramers[1]), daß stets Kochsalz von der Haut abgegeben wird, das ja nur aus den Schweißdrüsenausführungsgängen stammen und nur mit Wasser zugleich in diese übertreten kann, konnte ich nicht bestätigen[2]) —, schlossen wir, daß bis jetzt kein Beweis und auch nicht einmal ein Grund zu der Annahme vorliegt, daß bei gesunden Menschen die Schweißdrüsen sich aktiv an der Hergabe des insensibel abgegebenen Hautwassers beteiligen.

Sonach würden unter allen Bedingungen, die keine stärkere Entwärmung des Körpers verlangen, die Schweißdrüsen untätig sein; sie würden nicht perpetuierlich, vielmehr nur temporär tätige Drüsen darstellen.

Der Prozeß, der demnach unter den gewöhnlichen

---

[1]) Cramer, Arch. f. Hygiene **11**, 231, 1890.

[2]) Loewy und Wechselmann, a. a. O. S. 114.

Lebensbedingungen zu der dauernden Wasserabgabe durch die Haut führt, ist die physikalische Abdunstung von Wasser durch die Oberhaut.

Diese unterliegt nun ihrerseits großen Schwankungen, Schwankungen, die in verschiedener Weise gedeutet und mit der Beschaffenheit des umgebenden Mediums in Beziehung gesetzt wurden. Nach der Anschauung einzelner Autoren[1]) soll die Umgebungstemperatur, nach der anderer der Grad der Wasserdampfsättigung der Luft maßgebend sein. Nach wieder anderen soll die Beschaffenheit der Haut, speziell das Verhalten ihrer Gefäße, die Wasserdampfabgabe regeln, ohne daß eine quantitativ konstante Beziehung zu dem Verhalten der klimatischen Faktoren bestände.

Unsere eigenen Versuche sprachen in letzterem Sinne; „bei blutreicher, turgeszenter, warmer Haut wird stets mehr Wasser abgegeben als bei blasser, trockner, kühler, selbst wenn in ersterem Falle die Umgebungstemperatur erheblich kühler ist als im letzteren". — Also eine nur indirekte Wirkung selbst der Außentemperatur, die noch am ehesten die Wasserabgabe von der Haut zu ändern vermag. —

Ich habe nun die damaligen Versuche in größerem Umfange an einer Reihe weiterer Personen und nach der Richtung hin fortgesetzt, genauer festzustellen, welchen Einfluß das Milieu auf die Wasserdampfabgabe hat, ferner ob konstante individuelle Differenzen zwischen verschiedenen Personen bei gleichen Versuchsbedingungen, speziell bei gleichen Außentemperaturen bestehen, inwieweit bei ein und derselben Person trotz gleicher Umgebungstemperatur die Wasserabgabe schwanken kann, ob die verschiedenen Körperteile unter sich Verschiedenheiten in der Wasserabgabe darbieten.

Über diese Versuche soll im folgenden kurz berichtet werden.

Die Methode war die seinerzeit beschriebene. Die untersuchten Körperteile kamen in geeignete Metallhülsen, die, soweit die Extremitäten in Betracht kamen, peripherwärts geschlossen waren, zentral mittels einer passenden Gummimanschette luftdicht den Körperteil abschlossen. Hier trugen sie einen

---

[1]) Literatur vgl. bei Loewy und Wechselmann, l. c. S. 94.

Stutzen zum Eintritt der Luft, am anderen Ende einen gleichen für die austretende. Die eintretende Luft passierte ein Gehäuse, in dem sich ein — häufiger auf seine exakte Funktionierung geprüftes — Haarhygrometer mit Thermometer befand; ebenso ging die austretende durch eine analoge Einrichtung hindurch, von da aus durch eine Gasuhr und von hier in einen großen evakuierten Kessel. — Die Schnelligkeit des Luftdurchtritts konnte beliebig durch Hähne reguliert werden.

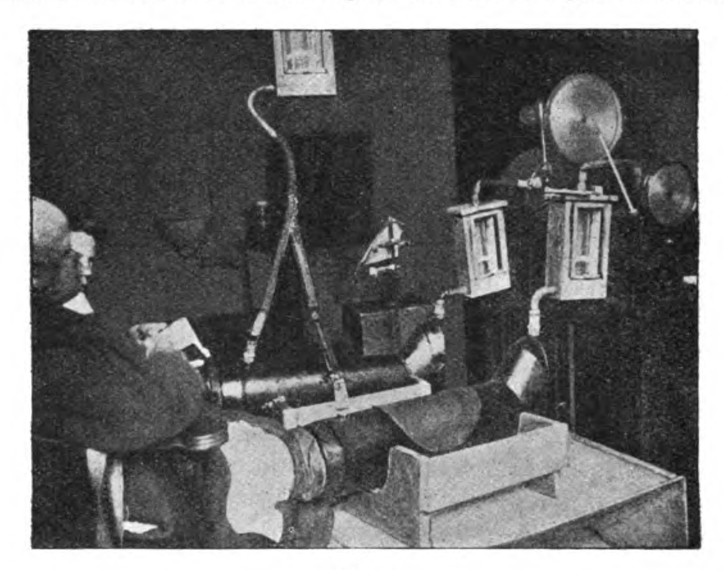


Fig. 1.

Die Fig. 1 gibt die Einrichtung zur Ermittlung der Wasserdampfabgabe der Beine photographisch wieder.

Zur Untersuchung der Wasserabgabe des Rumpfes diente ein Metallzylinder, den innen ein Drahtzylinder auskleidete, um ein Aufliegen des Rückens zu vermeiden. Der Zylinder trug beiderseits Gummimanschetten, die unter den Achseln und in der Kreuzgegend am Körper luftdicht befestigt wurden.

Zur Bestimmung der Wasserabgabe vom Gesamtkörper diente ein großer Kasten, dessen abnehmbarer Oberteil den Eintritt gestattete. In dem Kasten saß das Versuchsindividuum; es bekam ein Mundstück in den Mund, von dem aus ein kurzes weites Schlauchstück nach außen führte, so daß die Atmung direkt in das Zimmer geschah. Die Nase war mit

Klemme geschlossen. — Bei diesem Kasten trat die Luft am Kopfende ein und wurde am Fußende abgesogen (vgl. Fig. 2).

In jedem an einzelnen Körperteilen angestellten Versuche wurde die Länge des im Zylinder befindlichen Körperteiles und an vier Stellen sein Umfang gemessen, und daraus die Oberfläche berechnet. Dieser Wert diente dann zur Berechnung

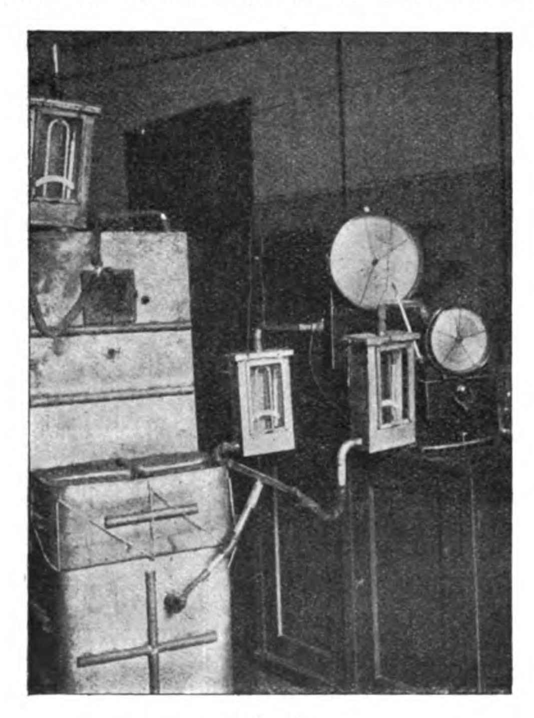


Fig. 2.

der Wasserabgabe auf den Quadratmeter Oberfläche bzw. auf die Gesamtkörperoberfläche, die aus dem Körpergewicht mit Hilfe der Meehschen Formel ermittelt war. —

Ich stelle die Generaltabelle sämtlicher Versuche voran, weil aus ihr die Zusammengehörigkeit der einzelnen Werte am besten ersichtlich ist. Aus ihr sind die folgenden Tabellen mit den jede einzelne Versuchsperson betreffenden Werten, geordnet nach den untersuchten Körperteilen und aufsteigenden Umgebungstemperaturen, hergestellt. Die Generaltabelle enthält zugleich Bemerkungen, die für die Beurteilung der untersuchten Personen von Bedeutung sind.

Perspirationsversuche 1911.

Generaltabelle.

Vers.-Nr. Person Datum	Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
1 Mula 16. I. 1911	a 22,2	7,7	11,3	10,40	rechtes Bein 967,0	23,23	**Mula, Adalbert**, 9 J. Fast geheilte Ichthyosis. Untersucht rechtes und linkes Bein.
	a 22,2	7,7	11,0	10,43	linkes Bein 1060,0	19,48	
	b 24,3	8,5	11,6	10,385	rechtes Bein 967,0	19,97	
	b 24,3	8,5	11,1	10,299	linkes Bein 1060,0	15,16	
	c 25,3	8,7	12,0	10,338	rechtes Bein 967,0	21,18	
	c 25,3	8,7	11,3	10,358	linkes Bein 1060,0	15,24	
2 Onasch 13. II.	23,1	7,8	9,3	8,584	rechtes Bein 994,25	7,770	**Onasch, Hans**, 7 J. Ichthyosis mittl. Grades. Untersucht r. Bein. — **Bein kalt.**
	25,2	7,9	9,8	8,529	do.	9,779	Oberschenkel warm, **Füße kalt.**
	27,6	8,7	10,8	8,512	do.	10,686	Fußsohlen noch kalt, Fußrücken warm.
	29,4	9,8	12,1	8,541	do.	11,854	**Alles warm.** Nirgends Schweiß. zum Schlusse Z.-T.: 30,2°; K.-T. in ano 36,9°.
3 Frl. L. 14. II.	a 23,2	5,0	10,3	7,936	rechtes Bein 1984,4	12,72	**L., Ella**, 22 J. Progredienter Fettschwund des Oberkörpers. Beine stark fetthaltig. Nates abnorm fettreich. Bemerkenswert, daß am Schlusse zwar Achselschweiß, aber sonst, abgesehen von dem direkt der Wärmequelle zugekehrten Rücken, Gefühl der Kälte mit Gänsehaut! Untersucht beide Beine zu gleicher Zeit!
	a 23,2	5,0	—	8,777	linkes Bein 1478,4	—	
	b 25,0	6,0	11,0	8,755	rechtes Bein 1984,4	13,24	
	b 25,0	6,0	10,8	8,661	linkes Bein 1478,4	16,87	
	c 27,8	5,9	12,1	8,501	rechtes Bein 1984,4	15,94	
	c 27,8	5,9	11,3	8,218	linkes Bein 1478,4	18,01	
	d 29,25	7,2	12,5	8,492	rechtes Bein 1984,4	13,61	
	d 29,25	7,2	12,0	8,400	linkes Bein 1478,4	16,36	
4 Beling 20. II.	a 25,4	6,6	11,1	7,027	rechtes Bein 1212,0	15,654	**Beling, Eitel**, Ichthyosis familiaria. Schwitzt leicht an Achsel und Stirn. Untersucht beide Beine zugleich. Körperoberfläche = 1,03 qm. Werte pro 1 qm also annähernd gleich den pro Körperoberfläche.
	a 25,4	6,6	10,8	6,618	linkes Bein 1092,5	15,267	
	b 26,0	7,0	11,2	6,579	rechtes Bein 1212,0	13,679	
	b 26,0	7,0	10,8	7,001	linkes Bein 1092,5	14,61	
	c 26,5	7,4	11,4	6,472	rechtes Bein 1212,0	12,817	
	c 26,5	7,4	10,9	6,611	linkes Bein 1092,5	12,709	
	d 27,4	8,2	12,3	6,425	rechtes Bein 1212,0	13,04	
	d 27,4	8,2	11,1	6,594	linkes Bein 1092,5	10,50	

Perspirationsversuche 1911 (Fortsetzung).

Vers.-Nr. Person Datum		Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
5 Frl. L. 28. II.	a	22,30	6,9	10,8	9,597	linker Arm 849,6	26,43	L., Frl., linker Arm, sitzt unbekleidet bis zum Nabel. Arm ganz fettarm! Vgl. Beinwerte!
	b	24,85	7,0	12,0	9,227	do.	32,58	Vor b Beginn der Heizung! Bis dahin ein Fenster offen. Gänsehaut an den fettarmen Körperteilen!
	c	25,4	7,3	12,0	9,244	do.	30,68	
	d	26,4	7,8	15,0	9,111	do.	46,33	Minimalwerte, da Haut feucht!
	e	27,3	8,0	16,0	9,195	do.	51,95	Bein schwitzte in Vers. 3 nicht, trotz höherer Zimmertemperatur.
9 Zm. Schweißdrüsenlos. 11. III.	a	26,15	8,1	11,8	7,782	rechter Arm 1085,4	15,915!	Zimmermacher, 56 J. Untersucht r. Arm und l. Bein.
		26,15	8,1	10,8	7,529	linkes Bein 1934,3	6,306!	
	b	26,2	8,1	11,8	7,871	rechter Arm 1085,4	16,10	
		26,2	8,1	10,8	7,572	linkes Bein 1934,3	6,343	
6 Dr. C. 2. III.	a	22,5	7,5	11,7	8,930	rechtes Bein 2128,0	8,399	Cr. Beim Beginn Kältegefühl, nach c behagliche Wärme. Haut am Arm auch am Ende nicht deutlich feucht.
		22,5	7,5	11,0	5,481	linker Arm 1168,0	9,855	
	b	23,1	7,9	11,8	8,841	Bein 2128,0	9,721	
		23,1	7,9	12,9	4,991	Arm 1168,0	12,82	
	c	23,6	8,1	12,0	8,384	Bein 2128,0	9,215	
		23,6	8,1	13,7	5,964	Arm 1168,0	17,16	
	d	24,0	8,2	12,1	8,212	Bein 2128,0	9,029	
		24,0	8,2	14,7	5,825	Arm 1168,0	19,45	
7 Frl. L. 3. III.	a	21,2	6,2	10,6	8,038	rechtes Bein 1791,0	11,848	Untersucht r. Bein und l. Arm. Frl. L. vgl. Vers. 5 und 3. Sitzt nackt am Apparat.
		21,2	6,2	11,4	6,753	linker Arm 896,0	23,518	
	b	21,1	6,1	10,8	7,841	Bein 1791,0	12,347	
		21,1	6,1	12,0	6,875	Arm 896,0	27,166	Bis hierher Gefühl von Kälte und Gänsehaut am Rumpf und Oberschenkel. Bein wärmer, keine Gänsehaut. Nun beginnt allgemeines Kältegefühl. Die bisher offenen Fenster geschlossen.
	c	21,0	6,0	11,2	7,965	Bein 1791,0	13,875	
		21,0	6,0	12,0	6,137	Arm 896,0	24,663	
	d	21,6	6,1	11,1	7,973	Bein 1791,0	13,355	
		21,6	6,1	12,2	6,763	Arm 896,0	27,631	
	e	22,4	6,9	12,4	7,920	Bein 1791,0	14,593	Gänsehaut jetzt schwächer ausgebildet. Haut fühlt sich wärmer an. Kein subjekt. Kältegefühl mehr.
		22,4	6,9	13,1	6,835	Arm 896,0	28,380	

Perspirationsversuche 1911 (Fortsetzung).

Vers.-Nr. Person Datum	Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
7 3. III. 1911 Fortsetzg. Fr. L.	f 24,9	7,4	12,5	7,959	Bein 1791	13,598	
	f 24,9	7,4	13,5	6,662	Arm 896	27,220	
	g 26,1	7,9	12,9	7,949	Bein 1791	13,314	Am Schluß noch geringe Gänsehaut. Kein Kälte-, doch auch kein Wärmegefühl. Untersuchte Haut trocken!
	g 26,1	7,9	13,9	6,931	Arm 896	27,850	
8 Zm. (vgl. Nr. 9) 7. III. 1911	a 24,6	7,3	9,6	8,932	rechtes Bein 2508	6,670	Untersucht rechtes Bein und linker Arm.
	a 24,6	7,3	10,2	7,871	linker Arm 1179	11,620	
	b 24,6	7,3	9,7	8,798	Bein 2508	6,855	
	b 24,6	7,3	10,6	7,912	Arm 1179	13,290	
	c 24,6	7,3	9,7	8,932	Bein 2508	6,960	
	c 24,6	7,3	10,7	7,822	Arm 1179	13,540	
10 Lauschke 6. I. 1911.	a 23,1	7,1	9,3	11,523	r. gesund. B. 871,3	17,457	Lauschke, Alfr., geb. 12. XII. 1902 Untersucht beide Beine zugleich. Poliomyelitis links; linkes Bein magerer als rechtes und kalt.
	a 23,1	7,1	8,8	12,336	l. krankes B. 944,1	13,328	
	b 24,0	7,6	9,5	11,583	gesundes B. 871,3	15,155	
	b 24,0	7,6	8,8	11,638	krankes B. 944,1	8,875	
	c 25,4	7,8	10,8	11,835	gesundes B. 871,3	24,450	
	c 25,4	7,8	9,8	11,297	krankes B, 944,1	14,360	Erhält heiße (Trauben-) Zuckerlösung. Gesicht hochrot. Wärmegefühl stark. Kein Schweiß bis zu Ende.
	d 26,8	7,7	11,0	11,424	gesundes B. 871,3	25,960	
	d 26,8	7,7	9,8	11,144	krankes B. 944,1	14,880	
	e 27,5	8,0	12,3	11,030	gesundes B. 871,3	32,660	
	e 27,5	8,0	11,5	11,628	krankes B. 944,1	25,866	
11 Dr. Cr. 22. III. 1911	a 25,4	8,0	12,0	12,490	rechter Arm 1105	27,130	Behaglich warm, kein Schweiß. Rock und Weste ausgezogen.
	a 25,4	8,0	12,0	9,058	linkes Bein 2290	9,492	
	b 25,2	8,1	12,1	10,710	rechter Arm 1105	23,260	
	b 25,2	8,1	12,1	11,392	linkes Bein 2290	11,970	
12 Prof. Z. 24. III. 1911	a 20,0	7,3	9,8	11,815	rechter Arm 1196	14,818	Mittel: Arm 15,35 g, Bein 12,50 g. Z. war vorher tätig gewesen. Haut warm und rot. Werte deshalb so auffällig hoch?
	a 20,0	7,3	10,7	12,825	linkes Bein 1978	13,230	
	b 20,5	7,3	10,0	11,732	rechter Arm 1196	15,890	
	b 20,5	7,3	10,4	12,527	linkes Bein 1978	11,780	

Perspirationsversuche 1911 (Fortsetzung).

Vers.-Nr. Person Datum	Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
13 Prof. Z. 27. III. 1911	a 20,5	7,0	9,3	10,068	rechter Arm 1164	11,94	Folgt Kastenversuch im Hemde (!). Ergibt nur 5,7 g und 6,0 g pro Oberfläche! Vgl. Vers. Nr. 13 a.
	a 20,5	7,0	10,3	9,144	linkes Bein 2307	7,846	
	b 20,5	7,0	9,6	10,252	rechter Arm 1164	13,74	
	b 20,5	7,0	10,5	9,592	linkes Bein 2307	8,729	
14 Dr. Rosenb. 29. III.	a 22,8	11,5	13,6	16,423	rechter Arm 1199	17,26	Folgt Versuch im Kasten, nackt. Hygrometer auf 100. Also unbrauchbare Minimalwerte: 8,061 g pro qm; 16,04 g pro Oberfläche.
	a 22,8	11,5	13,5	24,899	linkes Bein 2106	14,19	
	b 23,3	11,7	13,9	16,423	rechter Arm 1199	18,08	
	b 23,3	11,7	13,8	24,899	linkes Bein 2106	14,90	
15 Zm. 30. III.	a 24,4	10,8	11,6	16,029	rechter Arm 977,6	7,870	Mittel aus Arm und Bein: 5,888 pro qm. (Pro Oberfläche berechnet hieraus: 9,842 g).
	a 24,4	10,8	11,3	24,247	linkes Bein 1866,2	3,898	
	b 25,0	11,3	14,77	40,211	Gesamtoberfläche	5,025	(8,397 g pro Oberfläche u. Stunde.)
13 a Prof. Z. 27. III.	c 20,4	7,3	10,9	26,48	Gesamtoberfläche	2,76	Hemde anbehalten, geöffnet! Auf Gesamtoberfläche: 5,721 g.
	d 20,4	7,3	11,0	27,26	do.	2,92	do. Gesamtoberfläche: 6,053.
16 Dr. Cr. 4. IV.	a 22,0	6,3	10,1	26,94	Gesamtoberfläche = 2,051 qm	2,940	Nackt bis auf kurze Strümpfe. Auf Gesamtoberfläche: 6,030 g.
	b 23,0	6,5	11,45	27,182	do.	3,501	do. Gesamtoberfläche: 7,181 g.
	c 24,0	7,1	9,1	11,120	rechter Arm 1178,7	11,32	Cr. fühlte sich im Kasten warm. Auch bei c bis f Haut warm und rot.
	d 24,0	7,1	9,5	17,639	linkes Bein 1988,6	12,77	
	e 24,3	7,2	9,8	10,907	rechter Arm 1178,7	14,436	Feucht in Achseln.
	f 24,3	7,2	9,3	17,639	linkes Bein 1988,6	11,176	
17 Dr. Cr. 13. IV.	a 22,2	9,0	10,9	14,454	rechter Arm 1145,3	14,39	Gefühl von Kühle im Kasten und außerhalb.
	b 22,2	9,0	11,2	16,690	linkes Bein 1888	11,67	
	c 22,8	9,2	13,9	31,076	Gesamtoberfläche = 2,051 qm	4,278	Auf Gesamtoberfläche: 8,7747 g.
	d 23,0	9,3	14,1	31,329	do.	4,405	„ „ : 9 0355 g.
18 Frl. L. 24. IV.	a 20,15	9,5	17,4	51,438	Gesamtoberfläche = 1,6035 qm	12,248	Auf Gesamtoberfläche: 19,639 g.
	b 21,0	9,8	11,0	21,429	rechter Arm 832,35	18,530	
	c 21,0	9,8	12,9	20,926	linkes Bein 1977,8	15,632	

Perspirationsversuche 1911 (Fortsetzung).

Vers.-Nr. Person Datum	Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
19 W. Klavis	a 21,8	6,9	8,0	13,800	rechter Arm 725,76	21,68	Poliomyelitis anterior acuta am rechten Bein.
	b 21,8	6,9	9,4	14,721	linkes Bein, gesund 1152,57	25,28	
	c 22,1	7,1	8,0	14,014	rechter Arm 725,76	20,85	
	d 22,1	7,1	9,0	14,829	linkes Bein 1152,87	21,61	
	e 22,5	6,2	8,2	13,863	krankes Bein 885,55	18,786	
	f 22,5	6,2	9,2	14,586	gesund. Bein 1249,37	21,014	
	g 24,1	7,0	8,3	13,899	krankes Bein 885,55	12,242	
	h 24,1	7,0	9,3	14,363	gesund. Bein 1249,37	15,864	
	i 26,6	7,4	8,7	13,885	krankes Bein 885,55	12,23	
	k 26,6	7,4	10,0	14,512	gesund. Bein 1249,37	18,12	
	l 29,2	7,6	8,9	13,668	krankes Bein 885,55	12,038	
	m 29,2	7,6	9,8	14,215	gesund. Bein 1249,37	15,02	
20 Frl. L. 28. IV.	a 21,2	8,9	11,1	16,200	rechter Arm 950,25	22,50	
	b 21,2	8,9	11,9	17,884	linkes Bein 1861	17,30	
	c 21,6	9,0	11,4	15,965	Arm 950,25	24,19	
	d 21,6	9,0	11,7	17,990	Bein 1861	15,59	
	e 22,0	9,5	16,5	37,908	Gesamtoberfläche = 1,6035 qm	9,987	Auf Gesamtoberfläche 16,0135 g
	f 22,0	9,2	17,55	38,261	do.	12,06	„ „ 19,338 g.
	g 22,0	9,1	18,00	38,307	do.	12,46	„ „ 19,976 g.
21 Prof. Z. 31. V.	a 22,3	11,2	12,1	10,882	rechter Arm 1091,2	5,385	
	b 22,3	11,2	11,7	10,152	Rumpf 2923,4	1,042	
22 Frl. L. 3. VI.	a 21,2	8,8	12,92	10,917	rechter Arm 921,1	29,15?	Schweiß?
	b 21,2	8,8	10,0	10,406	Rumpf 2414	3,104	
	c 21,2	9,0	11,3	10,870	rechter Arm 897,6	16,71	} Vgl. Nr. 20.
	d 21,2	9,0	13,0	10,478	linkes Bein 1921,8	13,08	}
	e 21,4	9,3	14,6	25,570	Gesamtkörp. 16035	5,14?	8,2012 g auf Gesamtoberfläche.

Perspirationsversuche 1911 (Fortsetzung).

Vers.-Nr. Person Datum	Temperatur der eintretenden Luft °C	Wassergehalt der eintretenden Luft mg pro 1 l	Wassergehalt der austretenden Luft mg pro 1 l	Durchgesaugte Luftmenge (reduziert auf 0°, 760 mm, trocken) l	Untersuchte Körperoberfläche qcm	Wasserabgabe pro Stunde und qm Körperoberfläche g	Anmerkungen
23 Zm. 6. VI. 1911	a 22,6	12,2	13,7	15,006	rechter Arm 965,2	13,99	
	b 22,6	12,2	13,1	14,854	Rumpf 2580,2	3,109	
	c 22,8	12,4	14,2	11,256	rechter Arm 965,2	12,595	
	d 22,8	12,4	13,1	10,709	Rumpf 2580,2	1,743	
	e 21,9	11,8	16,0	30,331	Gesamtoberfläche 1,67 qm	4,580	Auf Gesamtoberfläche: 7,644 g.
	f 22,6	12,7	13,9	11,426	rechter Arm 904,7	9,093	
	g 22,6	12,7	13,1	11,125	linkes Bein 1955	1,365	
24 Dr. C. 13. VI. 1911	a_1 18,9	8,2	9,6	12,738	rechter Arm 1183,63	8,936	
	a_2 18,9	8,2	10,3	12,738	1183,63	13,560	
	b 18,9	8,2	10,7	12,909	linkes Bein 2025,0	9,562	
	c 19,5	9,0	10,3	12,734	rechter Arm 1122	8,853	
	d 19,5	9,0	10,2	12,685	Rumpf 2929,5	3,118	
	e 19,8	9,2	12,5	24,994	Gesamtkörper 2,051 qm	2,409	Auf Gesamtoberfläche: 4,9415 g.
25 Prof. Z. 23. VI. 1911	a 22,0	10,8	13,25	38,678	Gesamtkörper 2,1 qm	2,709	Auf Gesamtoberfläche: 5,695 g.
	b 22,4	11,1	11,7	12,229	rechter Arm 1094	4,024	
	c 22,4	11,1	12,7	11,894	Rumpf 3069	3,725	
	d 22,6	11,1	11,7	12,026	rechter Arm 1185,2	3,653	
	e 22,6	11,1	12,7	11,775	linkes Bein 2403	4,704	

Die Untersuchungen beziehen sich auf zehn Personen. Von diesen dienten vier schon zu den von Loewy und Wechselmann veröffentlichten Versuchsreihen, nämlich der eine schweißdrüsenlose (Zm.) und drei gesunde Männer (Prof. Z., Dr. Cr., Dr. Rb.). Dazu kommen drei Knaben mit leichter Ichthyosis, zwei mit abgelaufener Poliomyelitis acuta, eine 22 jährige Dame mit einer eigentümlichen Form von Fettschwund des Ober-

körpers bei starker Fettansammlung an den Nates und geringerer an den Beinen[1]).

a) Einfluß der Umgebung auf die Wasserdampfabgabe.

Meine Versuche können keinen Aufschluß geben über einen etwaigen Einfluß verschiedenen Wassergehaltes der Luft auf die Wasserabgabe. Die Wasserdampfsättigung der Luft des Zimmers, in dem die Versuche ausgeführt wurden. lag im Mittel um 50%, sie schwankte wenig, die Grenzen lagen nach oben gegen 60%, nach unten gegen 40%. Diese wurden aber nur selten erreicht. Die Wasserdampfsättigung der Zimmerluft kann daher als ziemlich konstant angenommen werden. Ich möchte hier gleichzeitig erwähnen, daß die Wasserdampfsättigung der aus den Apparaten austretenden Luft meist zwischen 70 und 85% lag; selten stieg sie auf 90%. Versuche, in denen sie höher anstieg, verwertete ich nicht, da die Gefahr nahe lag, daß nicht alles von der Körperoberfläche abgegebene Wasser durch das Hygrometer angezeigt wurde bzw. dieses bei fast vollkommener Wasserdampfsättigung der Luft nicht genügend genau arbeitete. Die Wasserdampfsättigung der austretenden Luft ließ sich durch Wechsel der Ventilationsgröße auf den gewünschten niedrigen Werten halten.

Am ehesten geben die Versuche Aufklärung über den Einfluß der Temperatur, der ja auch im allgemeinen am höchsten eingeschätzt wird. — Betrachten wir daraufhin zunächst die Ergebnisse an den einzelnen Versuchspersonen (Tabellen II bis V), so zeigt sich zuvörderst, daß ein Parallelismus zwischen Temperatur der Luft und Wasserdampfabgabe nicht besteht. Die Wasserabgabe nimmt nicht etwa mit steigender Lufttemperatur in entsprechender Weise zu oder umgekehrt ab. Das zeigen die Ergebnisse an allen Personen, wobei zunächst nur die an ein und demselben Körperteil gewonnenen ins Auge gefaßt werden mögen. Man vergleiche daraufhin die Ergebnisse an Z. (Tabelle II) am rechten Arm, linken Arm, linken Bein; Tabelle III (an Cr.

---

[1]) Die Krankengeschichte dieser wurde publiziert von A. Simons Eine seltene Trophoneurose („Lipodystrophia progressiva"). Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiatr. 5, 29 (Berlin 1911).

rechter Arm, und besonders linkes Bein; Tabelle V (Zm. schweißdrüsenlos) besonders deutlich linkes Bein, aber auch rechter Arm; Tabelle IV (Frl. L.): Bein und linker Arm zeigen die weitgehende Unabhängigkeit der Wasserabgabe von der Außentemperatur ganz besonders auffallend.

Tabelle II[1]).

Versuche an Prof. Z.

Person Versuchs-Nummer Datum	Untersuchter Körperteil	Temperatur der durchgehenden Luft °C	Durchgesaugte Luftmenge pro Min. l	Abgegebene Wassermenge pro Std. u. qm g	
Z.	r. Arm	20,0	11,815	14,818	
12. 24. III.		20,5	11,732	15,890	
13. 27. III.		20,5	10,068	11,940	
		20,5	10,252	13,740	
21. 31.V.		22,3	10,882	5,385	
25. 23.VI.		22,4	12,229	4,024	
		22,6	12,700	3,653	
Z. 7a.	lk. Bein	14,5	10,570	3,450	
12. 24. III.		20,0	12,825	13,230	
		20,5	12,527	11,780	
13. 27. III.		20,5	9,144	7,846	
		20,5	9,592	8,729	
25. 33. VI.		22,6	—	4,704	
Z. 7a.	r. Bein	14,5	10,664	3,460	
8a		16,0	10,570	5,570	
		16,5	12,695	4,549	
13a		20,25	12,058	7,093	CO_2-Atmung ohne subj. Dyspnoe
		21,05	10,944	6,438	
		21,10	11,521	6,132	
10a		24,2	8,669	6,581	
		24,9	8,455	15,32	Beginnender Schweiß.
		25,1	8,357	15,35	
		28,0	8,330	29,61	
21. 31.V.	Rumpf	22,3	10,152	1,042	
25. 23.VI.		22,4	11,894	3,725	
13. 27. III.	Gesamtkörper	20,4	26,48	2,76	
		20,4	27,26	2,92	
25. 23.VI.		22,0	38,68	2,709	

[1]) Bemerkung zu den Tabellen II bis V. Aus der in Spalte 1 angegebenen Versuchsnummer und dem Datum lassen sich ohne Zuhilfenahme der Generaltabelle die zum gleichen Versuch gehörigen, also zu gleicher Zeit aber an verschiedenen Körperteilen gewonnenen Werte übersehen. Die mit a bezeichneten Versuche sind der Arbeit von Loewy und Wechselmann entnommen.

Tabelle III.
Versuche an Dr. Cr.

Person Versuchsnummer Datum	Untersuchter Körperteil	Temperatur der durchgehenden Luft °C	Durchgesaugte Luftmenge pro Min. l	Abgegebene Wassermenge pro Std. u. qm g	
Cr.	lk. Arm	22,5	5,481	9,855	
6.		23,1	4,991	12,820	
2.III.1911		23,6	5,964	17,160	
		24,0	5,825	19,450	
24. 13.VI.	r. Arm	18,9	12,738	8,936	
		18,9	12,738	13,560	
		19,5	12,734	8,853	
17. 13.IV.		22,2	14,454	14,390	
16. 4.IV.		24,0	11,120	11,320	
		24,3	10,907	14,436	
11. 22.III.		25,2	10,710	23,260	
		25,4	12,490	27,130	
6a	lk. Bein	14,1	10,707	3,760	
		14,5	10,659	3,740	1/2 Std. nach 1 mg Atropin innerlich.
24. 13.VI.		18,9	12,909	9,562	
17. 13.IV.		22,2	16,690	11,670	
11a		22,3	9,133	3,141	
		22,65	9,620	4,962	
		22,9	9,925	5,404	
		22,9	6,433	5,292	
17. 13.IV.		24,0	17,639	12,770	
		24,3	17,639	11,176	
11a		24,6	8,922	5,370	
11. 23.III.		25,2	9,058	11,970	
		25,4	11,392	9,490	
11a		26,0	8,680	5,970	Hebt vor jedem Versuch Gewichte.
		27,2	8,544	6,366	
		29,0	8,092	7,188	
		29,5	7,943	7,740	
		29,9	7,881	7,001	
24. 13.VI.	Rumpf	19,5	12,685	3,118	
24. 13.VI.	Gesamtkörper	19,8	24,994	2,409	
16. 4.IV.		22,0	26,940	2,940	
17. 18.IV.		22,8	31,076	4,278	
		23,0	31,329	4,405	
16. 4.IV.		23,0	27,180	3,501	

Selbst bei Temperaturdifferenzen von 8 bis 10° braucht das Niveau der Wasserabgabe nicht verschieden zu sein. Das zeigen die zahlreichen Versuche an Cr.: Tabelle III linkes Bein, in denen die Außentemperaturen zwischen 18,9 und 29,9 liegen, sowie die der Tab. IV (Frl. L.) mit Temperaturunterschieden zwischen 21,0 und 29,25°. — Die Werte bei den

beiden Grenztemperaturen sind annähernd gleich; dazwischen finden sich zum Teil höhere, zum Teil niedrigere Werte.

Tabelle IV.

Versuche an Frl. L.

Person Versuchs-nummer Datum	Untersuchter Körperteil	Temperatur der durchgehenden Luft °C	Durchgesaugte Luftmenge pro Min. l	Abgegebene Wassermenge pro Std. u. qm g
Lucas. 7. 3. III.	r. Bein	21,0	7,965	13,875
		21,1	7,841	12,347
		21,2	8,038	11,850
		21,6	7,973	13,355
		22,4	7,920	14,593
3. 14. II.		23,2	7,936	12,720
7. 3. III.		24,9	7,959	13,598
3. 14. II.		25,0	8,755	13,240
7. 3. III.		26,1	7,949	13,314
3. 14. II.		27,8	8,501	15,940
		29,25	8,492	13,610
18. 24. IV.	lk. Bein	21,0	20,926	15,632
22. 3. VI.		21,2	10,478	13,080
20. 28. IV.		21,2	17,884	17,300
		21,6	17,990	15,590
3. 14. II.		25,0	8,661	16,870
		27,8	8,218	18,010
		29,25	8,400	16,360
18. 24. IV.	r. Arm	21,0	21,429	18,530
20. 28. IV.		21,2	16,200	22,500
		21,2	10,917	19,150
		21,2	10,870	16,710
		21,6	15,965	24,190
7. 3. III.	lk. Arm	21,0	6,137	24,663
		21,1	6,875	27,166
		21,2	6,753	23,518
		21,6	6,763	27,631
5. 28. II.		22,3	9,597	26,430
7. 3. III.		22,4	6,835	28,380
5. 28. II.		24,85	9,227	32,580
7. 3. III.		24,9	6,662	27,220
5. 28. II.		25,4	9,244	30,680
7. 3. III.		26,1	6,931	27,850
5. 28. II.		26,4	9,111	46,330
		27,3	9,195	51,950
22. 3.VI. 1911	Rumpf	27,3	10,406	3,104
18. 24. VI. 1911	Gesamt-körper	20,15	51,438	12,248
		22,0	37,908	9,987
		22,0	38,261	12,060
		22,0	38,307	12,460

Tabelle V. Versuche an dem schweißdrüsenlosen Manne Zm.

Person Vers.-Nr. Datum	Untersuchter Körperteil	Temperatur der durchgehenden Luft °C	Menge der durchgesaugten Luft pro Min. l	Abgegeb. Wassermenge pro Std. u. qm g	
Zm. 15a	r. Bein	21,7	9,674	3,636	
		22,0	9,569	3,221	Vorderarm in kalt. Wasser.
		22,0	10,137	4,582	
		22,3	9,554	5,087	2 bis 6 Min. nach der Abkühlung.
		22,4	9,549	5,84	
16a		23,0	9,865	. 1,785	2 bis 3 Min. nach Abwaschung d. r. Armes mit Alkohol und Äther.
7. III. 11		23,1	9,728	5,576	20 Min. nach d. Abwaschnng. Wärmegefühl.
		23,3	9,718	3,225	10 Min. nach Einfetten mit Lanolin.
		24,6	8,932	6,670	
		24,6	8,798	6,855	
		24,6	8,932	6,960	
Zm. 8a	lk. Bein	16,0	14,292	5,400	
		16,5	12,089	4,152	Abkühlung d. Eisstücke auf d.Stiefel Kältegefühl a.Bein.
4a		18,5	10,969	6,39	
		18,9	11,438	6,66	
		19,4	11,380	7,335	
9a		21,2	8,179	5,128	
		22,4	7,887	3,400	Kompression des Beines d. Luftmanschette. 25 mm Hg Druck.
10a		22,5	10,100	3,225	
9a		22,6	9,167	2,874	Kompression unter 72 mm Hg Druck.
		22,8	9,382	4,045	1½ bis 6 Min. nach Aufhebung der Kompression.
5a		23,2	6,358	5,143	
10a		28,1	8,846	4,238	
Zm.					
23. 6. VI.	r. Arm	22,6	15,009	13,99	
9. 11.III.		22,6	11,426	9,093	
		22,8	11,256	12,595	
15. 30.III.		24,4	16,029	7,870	
9. 11.III.		26,15	7,782	15,915	
23. 6.VI.		26,20	7,817	16,10	
Zm.					
8. 7.III.11	lk. Arm	24,6	7,871	11,62	
		24,6	7,912	13,29	
		24,6	7,822	13,54	
Zm. 9	Rumpf	22,6	14,854	3,109	
		22,8	10,709	1,743	
15. 30.III.	Gesamtkörper	25,0	40,211	5,025	
23. 6.VI.		21,9	30,331	4,58	

Dazu kommen die Werte an Mula (Generaltabelle I, Versuch 1). — Wo einmal ein Parallelgehen zwischen Lufttemperatur und Wasserabgabe gefunden wird, wie bei Onasch (Tabelle I, Versuch 2), da ergibt sich eine mit dem Wechsel der Temperatur vor sich gehende Änderung der Hautbeschaffenheit (vgl. die Bemerkungen zu Versuch 2, Tabelle I). Hier waren im Beginn des Versuches die Füße kalt, allmählich wurde der Fußrücken warm, die Fußsohlen blieben noch kalt, bis zum Schluß auch diese sich erwärmt hatten.

Macht sich hier schon die — zunächst ganz allgemein ausgedrückt — Beschaffenheit der Haut als maßgebend für den Umfang der Wasserabgabe bemerkbar, so weist das Verhalten letzterer bei gleichen Temperaturen, aber zu verschiedener Zeit noch mehr darauf hin, daß der jeweilige Zustand des Hautorganes bestimmend für seine Fähigkeit zur Wasserabdunstung ist, daß die Temperatur der umgebenden Atmosphäre — und was von dieser, gilt auch von den anderen physikalischen Besonderheiten der Luft, so daß man ganz allgemein sagen kann, daß der Zustand der Atmosphäre nur insoweit die physikalische Wasserabgabe zu beeinflussen vermag, als er die Beschaffenheit der Haut selbst beeinflußt.

Überblickt man die Zahlenwerte der einzelnen untersuchten Personen, so erkennt man, daß ihr Hautorgan sich zu verschiedenen Zeiten gleichen oder annähernd gleichen Temperaturen gegenüber ganz verschieden verhält. Nehmen wir die Versuche an Prof. Z. In Versuch 12 und 13 beträgt die Wasserabgabe pro 1 qm und Stunde bei **20,0** bis **20,5°** am Arm zwischen **11,94** g und **15,89** g, im Versuch 21 und 25 bei **22,3** bis **22,6°** nur **3,65** bis **5,38** g; sie ist also im ersten Falle um das Dreifache höher als im letzten.

Ebenso liegt die Wasserabgabe vom Rumpf in Versuch 25 bei **22,4°** um fast das Vierfache höher als im Versuch 21 bei **22,3°**.

Die Versuche an den Beinen ergeben das gleiche, nur weniger ausgesprochen.

Bei Cr. (Tabelle III) haben wir am linken Bein einmal bei **22,2°** eine Wasserabgabe von **11,67** g pro Stunde und 1 qm; in einem anderen Versuche bei **22,3** bis **22,9°** nur **3,14** g bis

5,29 g. — Bei 24 bis 24,3° im erstgenannten Versuche 11,17 bis 12,77 g; demgegenüber bei 26,0 bis 29,9° in dem an zweiter Stelle erwähnten Versuche 5,97 bis 7,74 g.

Konstanter sind die Werte bei Zm. und bei Frl. L., wenn auch bei letzterer die Wasserabgabe des linken Armes gleichfalls deutliche zeitliche Verschiedenheiten bei gleichen Temperaturen erkennen läßt.

Man könnte vermuten, daß eine direkte Wirkung der Lufttemperatur nicht zum Vorschein kommt dadurch, daß sie verdeckt wird durch ein wechselndes Verhalten anderer Faktoren. In Betracht käme hier verschieden starke Ventilation. Jedoch auch diese erweist sich nicht als maßgebend.

Am besten beweisen dies die Versuche mit stark differenter Ventilation bei annähernd gleicher Temperatur. So besonders die betreffend die Wasserabgabe des Gesamtkörpers von Prof. Z. (Tabelle II); trotzdem die Ventilation des Kastens zwischen 26,5 und 38,7 l pro Minute schwankt bei 20,4 bis 22,0°, erweist sich die Wasserabgabe als vollkommen gleich.

Ebenso ist es bei Frl. L. (Tabelle IV): Bei einer Ventilation von 51,4 l (20,15°) gibt der Gesamtkörper nicht mehr Wasser ab, als bei 38,3 l (22,0°), nämlich 12,25 g gegenüber 12,26 g.

Dagegen steigt die Wasserabgabe des Gesamtkörpers bei Cr. mit steigender Ventilation, aber auch steigender Temperatur an.

In den Versuchen an den einzelnen Körperteilen liegen die Ventilationswerte meist zu nahe aneinander, um sichere Schlüsse zu erlauben. Zu verwerten wären nur die Versuche von Zm. (Tabelle V) am rechten Arm, wo pro Minute 7,8 l bis 16 l durchgesaugt wurden. Auch hier ist ein Einfluß der Ventilationsgröße nicht zu erkennen: einmal liegt die Wasserabgabe bei starker Ventilation hoch, einmal auffallend niedrig. — Ebenso ist es bei Cr. (Tabelle III): hohe Ventilation geht hier in Versuchen am linken Bein einmal (vgl. Versuch 17) mit hoher Wasserabgabe einher, ein anderes Mal (Versuch 11a) mit geringer; und auch an L. (Tabelle IV) sind die Ergebnisse am linken Arm und Bein wechselnd. —

Muß die Analyse der bisher besprochenen Versuche schon zu dem Schlusse führen, daß eine direkte Beziehung zwischen

umgebender Atmosphäre und Umfang der Wasserabgabe nicht besteht, vielmehr die zeitige Beschaffenheit der Haut die Hauptrolle spielt, so wird dieser durch einige weitere noch mehr gesichert.

Ich vermochte durch Beeinflussung der Haut bei ungeänderten äußeren Bedingungen die Wasserabgabe erheblich zu verändern.

Zunächst versuchte ich eine reflektorische Änderung der Haut herbeizuführen. In Versuchen an Zm., in denen die Wasserabgabe des rechten Beines bestimmt wurde, ließ ich den rechten Vorderarm in kaltes Wasser tauchen (vgl. Tab. V Versuch 15a). Unmittelbar darauf sank die abgegebene Wassermenge von **3,64** auf **3,22** g pro Stunde und 1 qm berechnet; 2 Min. nach dem Herausnehmen und Trocknen des Armes waren sie auf **5,08** g und blieb so für weitere 15 Minuten. Dabei waren die Temperatur der den Stiefel durchstreichenden Luft und die Ventilationsgröße nahezu unverändert geblieben.

In Vers. 16a, gleichfalls an Zm., betrug die Wasserabgabe am rechten Bein, 2 bis 3 Min. nach Abwaschen des rechten Armes mit Alkohol-Äther, nur **1,78** g, 20 Min. danach, nachdem wieder allgemeines Wärmegefühl eingetreten war, dagegen **5,58** g.

In einem anderen Versuch wurden Eisstücke auf den Stiefel gelegt (vgl. Versuch 8a an Zm.). Bei der schnellen Luftdurchleitung kühlte sich die durchtretende Luft nach Angabe des im Ausgangshygrometer befindlichen Thermometers nicht ab. Die Kältestrahlung bewirkte aber eine Verminderung der Wasserabgabe von **5,4** g auf **4,1** g.

Endlich seien zwei Versuche an Zm. (vgl. Versuch 9a) erwähnt, in denen die Blutzirkulation im untersuchten Bein durch Kompression desselben am Oberschenkel oberhalb des Stiefels erschwert wurde. Die Kompression geschah mittels einer aufblasbaren Gummimanschette, wie sie zur Blutdruckbestimmung nach Riva-Rocci benutzt zu werden pflegt, unter Einschaltung eines Quecksilbermanometers, an dem der Grad der Kompression abgelesen wurde. — Die Wasserabgabe, die zuvor **5,13** g betrug, sank bei einer Kompression von 25 mm Hg Druck, durch die also nur eine capillare und venöse Störung hervorgerufen wurde, auf **3,4** g; bei einer von 72 mm

Druck auf 2,9 g. Nach Aufhebung der Kompression stieg in 6 Minuten die Wasserabgabe wieder auf 4,04 g. — Wie die Versuchsdaten der Tabellen erweisen, waren Ventilation und Temperatur fast gleich geblieben.

Weiter wurde an Prof. Z. (Tab. II) ein Versuch mit Einatmung mäßiger Kohlensäuremengen ausgeführt. Die Einatmung geschah 30 Minuten lang und war derart geregelt, daß die an der Gasuhr zugleich abgelesene Atemgröße 11 bis 12 l pro Minute ausmachte. Subjektive Dyspnoe bestand nicht. Ventilationsgröße und Temperatur wurden wiederum annähernd gleich gehalten (s. Versuch 13). Die Wasserabgabe, die vor der Kohlensäureatmung 7,1 g betrug, sank, nachdem 12 Minuten CO_2 zugeführt war, auf 6,4 g und weiter nach 21 Minuten auf 6,1 g.

Die Erklärung der vorstehenden Ergebnisse, betreffend die willkürliche Veränderung der Wasserabgabe, ist für die Versuche mit Kältestrahlung und mit Kohlensäureatmung gegeben durch ihren vasomotorischen Effekt. Die Contraction der Hautgefäße bewirkt eine verminderte Durchblutung der Haut, damit eine Abkühlung der Hautoberfläche und damit zugleich eine Verringerung der Wasserverdampfung von der Oberfläche.

In den Versuchen mit venöser und — bei 72 mm Hg Druck — vielleicht auch schon arterieller Kompression spielen vasomotorische Veränderungen der Gefäßweite nicht die gleiche Rolle. Aber das in den Hautcapillaren und Venen stagnierende Blut wird wiederum zu einer Temperaturherabsetzung der Haut und zu einer Einschränkung der Wasserverdampfung führen.

Über den Zusammenhang zwischen dem Umfang der physikalischen Wasserabgabe von der Haut und dem Zustand der umgebenden Atmosphäre möchte ich auf Grund meiner Ergebnisse der folgenden Auffassung zuneigen: Die physikalische Wasserabgabe stellt einen Verdampfungsprozeß dar; dieser muß natürlich beeinflußt werden in gesetzmäßigem Sinne von der Temperatur der Atmosphäre, ihrem Wassergehalt, ihrer Bewegung, also ihren sog. thermischen Faktoren. Aber diese Faktoren wirken im Einzelfalle quantitativ ganz verschieden auf die Oberfläche selbst des gleichen Körperteiles, da dieser nicht eine stets gleiche verdampfende Fläche darstellt.

Das zeitlich wechselnde Verhalten ein und desselben Teiles der Oberfläche beruht im wesentlichen auf ihrer wechselnden Temperatur. Alles, was, sei es klimatisch, also aus äußeren Ursachen, sei es experimentell durch Änderung äußerer und innerer Bedingungen, sei es pathologisch, also nur aus im Körper selbst gelegener Veranlassung, die Hauttemperatur ändert, ändert damit auch die Wasserabgabe, so daß bei Wirksamwerden innerer Ursachen die Wirkung der äußeren in ihrer Bedeutung erheblich abgeschwächt werden, unter Umständen kaum zum Ausdruck kommen kann.

Alles, was die Temperatur der Haut erniedrigt, setzt die Wasserabgabe herab, was sie steigert, erhöht sie.

b) Regionäre und individuelle Verschiedenheiten der Wasserabgabe.

Für die Unterschiede in der Menge des abgegebenen Wasserdampfes an ein und demselben Körperteil unter gleichen äußeren Bedingungen ist in den vorstehenden Ausführungen im wesentlichen die verschiedene Temperatur der Haut verantwortlich gemacht worden, also ein physikalischer Faktor. Man könnte daran denken, daß anatomische Veränderungen mit beteiligt wären an der verminderten Wasserabgabe, etwa die mit der Kälte einhergehende Verminderung der Blutfüllung oder Durchfeuchtung der Haut oder die zugleich eintretende Contraction der Haut. Aber wenn bei Kältecontraction die Haut auch blutleer wird, so bleibt das Maschengewebe des Stratum Malpighi doch noch mit Lymphe gefüllt, und die Herabsetzung der Wasserabgabe ist so erheblich und geschieht so schnell, daß man sie nicht wohl mit Flüssigkeitsmangel unter der Epidermis in Zusammenhang bringen kann, und die Contraction der Haut ändert wohl die Form ihrer Oberfläche, aber nicht wesentlich ihre Größe. Möglich wäre ja, daß die mit dem verschiedenen Contractionszustande der Haut- bzw. Hautgefäßmuskeln sich ändernde histologische Beschaffenheit der Oberhaut zu einer verschiedenen Durchdringbarkeit für Wasserdampf führt. Jedoch ist hierüber nichts Bestimmtes bekannt. —

Nun zeigt aber ein Überblick der Tabellen, daß auch — an der gleichen Versuchsperson — unter den gleichen

äußeren Bedingungen die verschiedenen Körperteile ganz verschiedene Wassermengen abgeben können.

Ob hier gleichfalls die Annahme der verschiedenen Hauttemperatur als wesentliches Erklärungsmoment genügt, muß noch erörtert werden.

Betrachten wir zunächst die Versuche an Gesunden.

Bei Prof. Z. (vgl. Tabelle II) ergibt sich, daß von den gleichzeitig gewonnenen Werten die am Arme höher liegen als die am Beine (Versuche 12 und 13); einmal (Versuch 25) gibt das Bein mehr Wasser ab als der Arm. — Der Rumpf gibt in einem Versuche (Nr. 21) auffallend weniger Wasser ab als der Arm, in einem zweiten etwa gleichviel. — Der Gesamtkörper gibt stets weniger Wasser ab als die Extremitäten; nur ein am Rumpf erhaltener Wert liegt unter dem für den Gesamtkörper.

Gleichmäßiger sind die Ergebnisse an Cr. (Tabelle III). Abgesehen von einem Versuche (24) gibt der Arm mehr Wasser ab als das Bein, der Rumpf weniger als Arm und Bein (Versuche 16 und 17), der Gesamtkörper gleichfalls. Ausnahmslos findet sich dasselbe Verhalten bei Zm. Am meisten Wasser geben die Arme ab, weniger die Beine, noch weniger Rumpf und Gesamtkörper.

Wenn auch nicht ausnahmslos, läßt sich doch erkennen, daß die Wasserabgabe unter den gleichen Versuchsbedingungen sank von Arm über Bein zu Rumpf und Gesamtkörper. Dies ließe sich nun einfach physikalisch erklären: derjenige Körperteil, der am meisten und häufigsten entblößt und der Luft direkt ausgesetzt wird, der Arm, wurde am wenigsten im Sinne einer Gefäßcontraction und damit einer Abkühlung beeinflußt, mehr das Bein, und der gewöhnlich am meisten geschützte Rumpf am intensivsten. Für den Gesamtkörper kommt in Betracht, daß er sich wie der am meisten kälteempfindliche Teil — der Rumpf — verhalten muß, da ja von diesem aus reflektorisch die Gefäße der übrigen Körperoberfläche mit verengert werden.

Eine physikalische Erklärung gestatten auch die Resultate an den beiden Kranken mit Poliomyelitis anterior. Wie die Versuche 10 und 19 der Tabelle I zeigen, wird von dem kranken, blassen und kühlen Bein stets weniger Wasser

abgegeben als von dem gesunden, und Aufnahme heißer Zuckerlösung (Versuch 10), die zu starkem Wärmegefühl führte, steigerte die Wasserabgabe auf der gesunden Seite weit mehr als auf der kranken.

Hier handelt es sich um vasomotorische Störungen mit ihren Folgen.

Gegen die rein physikalische Erklärung der an den verschiedenen Körperteilen verschiedenen Wasserabgabe bei den gesunden Menschen müssen sich jedoch einige Bedenken erheben. Man sollte nämlich meinen, daß wenn die durch die Höhe der Umgebungstemperatur beeinflußte Temperatur der Haut für die Menge des abgegebenen Wasserdampfes maßgebend wäre, dann bei genügend hoher Außentemperatur, d. h. bei einer solchen, die auf die Gefäße keiner Körperregion mehr als Kältereiz wirkt, die regionären Differenzen in der Wasserabgabe fortfallen müßten. Das ist aber selbst bei Lufttemperaturen von 28 bis 29° nicht der Fall; in den Versuchen an Dr. Cr. (Tabelle III, Versuch 11a) und an Zm. (Tabelle V, Versuch 10a) — ebenso übrigens auch bei L. (Tabelle IV, Versuch 3) — bleibt dabei die geringere Wasserabgabe am Bein, die höhere am Arm bestehen.

Es dürften also doch wohl, bei den verschiedenen Personen übrigens quantitativ wechselnde, anatomische Unterschiede bestehen, deren Natur bis jetzt noch nicht genauer bekannt ist.

Abgesehen von dem schweiß- und talgdrüsenlosen Zm. kommt allerdings ein Moment in Frage, das zu regionären (und individuellen) Differenzen der Wasserabgabe führen könnte, das wäre ein an den verschiedenen Körperteilen (bzw. bei vorschiedenen Personen [vgl. später]) verschieden starker Fettüberzug.

Unna[1]) und späterhin Cramer[2]) und Barrat[3]), sowie Wechselmann und ich[4]) haben gezeigt, daß ein Fettüberzug die Wasserabgabe von der Haut vermindert. Eine verschiedene Dicke der Fettschicht auf der Haut der verschiedenen Körper-

[1]) P. G. Unna, Über die insensible Respiration der Haut. Deutsche Med.-Zeitg. 1890, Nr. 72/73.

[2]) Cramer, Arch. f. Hygiene 10, 1890.

[3]) Barrat, Journ. of Physiol. 21, 1897 u. 24, 1899.

[4]) Loewy und Wechselmann, l. c. S. 110.

teile (eventuell auch bei verschiedenen Personen) mag einen Einfluß auf die Differenzen in der Wasserabgabe haben, aber die Wirkung der natürlichen Fettschicht ist doch zu gering, um die meist sehr erheblichen Unterschiede in der Wasserabgabe zu erklären.

An anatomische Verschiedenheiten der Epidermis muß man in erster Linie denken bei dem einen der an leichter Ichthyosis leidenden Kranken (vgl. Tabelle I, Versuch 1), bei dem sich Differenzen der Wasserabgabe an beiden Beinen zeigen. Bei dem zweiten (Versuch 4) verhalten sich beide Beine gleich. — Die absolute Höhe der Wasserabgabe ist übrigens bei keinem der drei Kranken mit Ichthyosis (Tabelle I, Versuche 1, 2, 4) gegen die Norm herabgesetzt; bei zweien ist sie vielmehr auffallend beträchtlich.

Wie die ganz konstanten Ergebnisse an dem an „Lipodystrophie" leidenden Fräulein L. (vgl. Tabelle IV) zu deuten sind, ist nicht sicher. Auch hier ist der am Rumpf gefundene Wert wieder sehr niedrig; die Werte für den Gesamtkörper liegen höher, aber niedriger als die an Armen und Beinen gefundenen. Am auffallendsten ist der durchgehend gefundene Unterschied zwischen den ganz fettlosen Armen und den abnorm fettreichen Beinen. Von ersteren wird weit mehr (bis zum doppelten) Wasser abgegeben als von letzteren, gleichgültig, bei welcher Temperatur die Versuche angestellt waren.

Außer den regionären Verschiedenheiten bei derselben Person scheinen nun aber auch individuelle Unterschiede der Wasserabgabe vorhanden zu sein, in dem Sinne, daß unter ähnlichen äußeren Bedingungen bei verschiedenen Personen eine verschieden starke Wasserabgabe erfolgt.

Bei den Differenzen, die ein und dieselbe Person schon zu verschiedenen Zeiten zeigt, läßt sich die Annahme von Verschiedenheiten im Umfang der Wasserabgabe zwischen mehreren Personen — natürlich Gleichheit der äußeren Bedingungen vorausgesetzt — nicht auf die Betrachtung einzelner Werte gründen. Vielmehr muß das Niveau der Hautwasserausscheidung unter allen Bedingungen charakteristische Unterschiede zeigen.

Das war schon bei zwei von den seinerzeit untersuchten

Schweißdrüsenlosen der Fall; stets gab der eine etwa nur die Hälfte der Wassermenge des anderen ab. Das Gesamtmittel, das Versuche bei ganz verschiedenen Temperaturen umfaßte, während die Wasserdampfsättigung der Zimmerluft fast stets gleich war, betrug, pro Quadratmeter Körperoberfläche und Stunde berechnet, bei dem einen (K.) 12 g, bei dem zweiten (Zm.) ca. 6 g. — Untersucht wurde stets die Wasserabgabe eines Beines.

Das gleiche zeigt sich auch in den neuen Versuchen.

Am eindeutigsten tritt die Differenz der Wasserabgabe bei Betrachtung der Werte für den Gesamtkörper zutage. Aus ihnen berechnet sich:

Bei Zm. (schweißdrüsenlos, 30 bis 40 l Ventilation, 21,1 bis 25° Zimmertemp.): **4,58** bis **5,0** g pro qm und Std. (2 Versuche);

bei Prof. Z. (26,5 bis 38 l Ventilation, 20,4 bis 22° Zimmertemperatur): **2,1** bis **2,9** g pro qm und Std. (3 Versuche);

bei Dr. Cr. (25 bis 31 l Ventilation, 19,8 bis 23° Zimmertemperatur): **2,4** bis **4,4** g pro qm und Std. (5 Versuche);

dagegen bei Dr. Rg. (16,4 bis 24 l Ventilation, 22,8 bis 23,3° Zimmertemp.): mehr als **8,1** g pro qm und Std. (1 Versuch);

bei Frl. L. (28 bis 51 l Ventilation, 20,1 bis 22° Zimmertemperatur): **10,0** bis **12,5** g pro qm und Std. (4 Versuche).

Die Zahl der Versuche ist für jedes Individuum nur gering, aber zur Kennzeichnung der Differenzen wohl ausreichend. Die Lufttemperaturen sind mit Rücksicht auf den unbekleidet untersuchten Körper niedrig. Die Differenzen könnten sich also aus einer verschiedenen Empfindlichkeit der Haut erklären, derart, daß bei einzelnen die vorbeistreichende Luft schon einen mehr oder weniger erheblichen Kältereiz abgibt, bei anderen nicht.

Die individuell verschiedene Wasserabgabe würde in diesem Falle auf einer wechselnden Reaktion der Gefäße auf den Temperaturreiz beruhen.

Auch wenn man von den an einzelnen Körperteilen gewonnenen Werten ausgeht, treten individuelle Unterschiede zutage. Allerdings kommen hier die Differenzen ins Spiel, die zwischen den verschiedenen Körperabschnitten der gleichen Person unter den gleichen Bedingungen und

selbst zur gleichen Zeit bestehen. Dafür aber ergibt die bei weitem größere Zahl der Versuche eine größere Sicherheit in der Konstatierung individueller Verschiedenheiten. Legt man nur die vier Personen, die solchen unterworfen wurden, zugrunde, so ergibt sich, daß bei Frl. L. bei Temperaturen zwischen 21° und 29,25° in 33 Versuchen nur ein Wert unter 12 g pro Quadratmeter und Stunde lag, 12 Werte über 20 g und das **Maximum 32,6** g erreichte.

Bei Dr. Cr. beträgt die Wasserabgabe in den Versuchen über 20° (bis 29,9°) 12mal mehr als 10 g pro Quadratmeter und Stunde, 12mal unter 10 g. — Über 20 g wurden nur zweimal abgegeben.

Prof. Z. scheidet aus bei Temperaturen zwischen 20° und 28° 6mal mehr als 10 g bis zum **Maximum** von nur **15,9** g; 8mal dagegen weniger als 10 g.

Endlich Zm. gibt über 10 g ab — bis zum **Maximum** von **16,1** g — (bei Tempereturen über 20°) 9mal, und zwar nur von den Armen; 18mal (d. h. in allen Versuchen an den Beinen) weniger als 10 g, dabei oft weniger als 5 g bei Temperaturen bis zu 28,1°. — Die individuellen Differenzen bleiben auch bestehen, wenn man die Wasserabgabe an den gleichen Körperteilen der verschiedenen Personen und bei hohen Temperaturen (über 24°) vergleicht, bei denen die Wirkungen der physikalischen Wärmeregulation nicht mehr ins Spiel kommen können.

Es zeigt also die physikalische Wasserabgabe von einem Individuum zum anderen Unterschiede nicht nur, wenn man gleiche äußere Bedingungen dem Vergleich zugrunde legt; sie wird auch von wechselnden Temperaturverhältnissen und bei wechselndem Verhalten der Haut quantitativ verschieden bei verschiedenen Individuen beeinflußt.

Die mitgeteilten Werte zeigen zahlenmäßig an einem größeren Beobachtungsmaterial, daß es nicht angängig ist, aus der Wasserabgabe eines Körperteiles auf die Gesamtwasserabgabe des Körpers unter den betreffenden Versuchsbedingungen zu schließen. Selbst wenn die Bedingungen, insbesondere die Umgebungstemperatur, so gewählt sind, daß der

Effekt der physikalischen Wärmeregulation auf die Haut ausgeschaltet ist, ist die Umrechnung der Wasserabgabe von einem Körperteil auf den Gesamtkörper nicht immer zulässig. — Es ist mehr Sache des Zufalls, wenn einmal aus der Wasserabgabe von einem Körperteil sich für die Gesamtkörperoberfläche annähernd so viel Wasser berechnet, wie im Versuch wirklich gefunden wird (vgl. Tab. VI, Versuch 23).

Im allgemeinen liegen die aus den am Arm und Bein ermittelten Werten für den Gesamtkörper berechneten höher als die vom Gesamtkörper wirklich gefundenen. Sie bleiben auch höher, wenn man in Betracht zieht, daß bei den die Gesamtoberfläche betreffenden Versuchen vom Gefäß, d. h. von ca. 5% der Oberfläche kein Wasser abgegeben wurde, die Werte sich also um 5% erhöhen.

Wie wechselnd sich im einzelnen die Verhältnisse gestalten können, läßt sich aus denjenigen Versuchen erkennen, in denen teils nebeneinander, teils nacheinander die Wasserabgabe an Arm, Bein, auch Rumpf und vom Gesamtkörper ermittelt wurde.

Über die Oberfläche der einzelnen Körperteile liegen Bestimmungen vor, von denen sich eine Zusammenstellung bei Vierordt[1]) findet. Mit Hilfe dieser Werte läßt sich mit einer für den vorliegenden Zweck hinreichenden Genauigkeit aus meinen pro Quadratmeter berechneten Werten umrechnen, wie hoch sich die Wasserabgabe für den einzelnen Körperteil stellt. — Arme, Beine und Rumpf machen ca. 82% der gesamten Körperoberfläche aus. Ohne einen Fehler zu begehen, der den Sinn fälschen würde, kann man für die Wasserabgabe der noch fehlenden nur 18% der Oberfläche (Kopf, Hals, Beckengegend) 18% der aus Armen, Beinen und Rumpf sich ergebenden Summe einsetzen und dadurch eine Zahl gewinnen, die angibt, wie hoch annähernd die Wasserabgabe des Gesamtkörpers liegen würde, wenn sie durch Addition der an den untersuchten Körperteilen gefundenen Werte berechnet würde.

Die Ergebnisse dieser Rechnungen sind auf Tabelle VI vereinigt.

---

[1]) H. Vierordt, Daten und Tabellen für Mediziner. 2. Aufl., S. 36. Jena 1893.

Tabelle VI.

1	2	3	4	5	6	7	8	
Versuch Nr.	Lufttemperatur °C	Untersuchter Körperteil	Wasserabgabe g	Summe der gefundenen Wassermenge g	Proz. Anteil an der gefundenen Wassermenge	Für den Gesamtkörper berechnete Wassermenge in g	Für den Gesamtkörper gefundene Wassermenge in g	
22 an L.	21,2—21,4	Beine	9,72	16,20	60,0	20,0	8,2	
		Arme	5,73		35,4			
		Rumpf	0,75		4,6			
20 an L.	21,2—22,0	Beine	12,2	21,0	58,1	25,6	18,45	
		Arme	8,10		38,5			
		Rumpf	0,75		3,4			Wert aus Vers. 22 eingesetzt
23 an Zm.	21,9—22,6	Beine	1,06	5,93	17,9	7,64	7,1	
		Arme	4,27		72,0			
		Rumpf	0,60		10,1			
24 an Cr.	18,9—19,8	Beine	3,92	13,98	65,2	17,04	4,94	
		Arme	9,12		28,1			
		Rumpf	0,94		6,7			
25 an Prof. Z.	22,0—22,6	Beine	4,59	7,474	61,4	9,11	5,69	
		Arme	1,73		23,1			
		Rumpf	1,15		15,4			

Zunächst sei auf Stab 6 hingewiesen. Er zeigt, in wie schwankendem Verhältnis die einzelnen untersuchten Körperteile an der insgesamt gefundenen Wassermenge (Stab 5) sich beteiligen, trotz in fast allen Fällen gleicher Versuchsbedingungen. — Die Tabelle zeigt weiter, wie stark unter gleichen Verhältnissen die absoluten Werte für die Wasserabgabe schwanken können (Stab 5); endlich wie stark die Differenzen sein können, die zwischen den auf Grund der gefundenen Teilwerte für den Gesamtkörper berechneten und den im direkten Versuch am Gesamtkörper gefundenen Wassermengen bestehen. Es zeigt sich, daß schon die Summe der für Arme, Beine, Rumpf ermittelten Zahlen (bis auf die an Zm. [Vers. 23]), höher liegt als der Wert, den die direkte Bestimmung am Gesamtkörper lieferte.

Es wurde oben schon darauf hingewiesen, daß bei den gegebenen Lufttemperaturen gerade in den Versuchen am Gesamtkörper eine vasokonstriktorische Reizung aufgetreten sein kann, die die Wasserabgabe herabdrückte (Stab 8). Bei Temperaturen von etwa 30° würden die berechneten und gefundenen Werte besser übereinstimmen.

Jedenfalls können die gefundenen Werte für die Gesamtwasserabgabe nur für den nackten oder ganz wenig bekleideten Körper gelten und dürfen nicht etwa als Maß genommen werden für die Wasserabgabe bei gleichen Außentemperaturen am normal durch Kleidung geschützten Körper.

Außer den bereits S. 262, 264 bis 265 und 268 angegebenen spezielleren Schlußfolgerungen würde man zu dem allgemeinen Schluß kommen müssen, daß man einigermaßen Sicheres über die physikalische Wasserabgabe von der Haut nur bezüglich der maximal und minimal gefundenen Werte aussagen kann, daß man jedoch nicht berechtigt ist, beide in direkte Abhängigkeit von der Beschaffenheit der umgebenden Atmosphäre zu bringen und etwa für bestimmte äußere Bedingungen eine bestimmte Höhe der Wasserabgabe anzusetzen. Dagegen sprechen die zu gleicher Zeit bestehenden Differenzen an den verschiedenen Körperteilen der gleichen Personen, die Differenzen an ein und demselben Körperteil zu verschiedenen Zeiten und das wechselnde Niveau der Wasserabgabe bei verschiedenen Personen.

Der wesentlich maßgebende Faktor für den Umfang der physikalischen Hautwasserverdunstung ist der Zustand des Hautorgans, und zwar in physikalischer Hinsicht die Temperatur seiner oberflächlichen Schichten, wozu sich anatomische Besonderheiten gesellen mögen, die noch weiterer Erforschung bedürfen.

Über den Temperaturkoeffizienten des elektrischen Leitvermögens im lebenden und toten Gewebe.

Von

W. J. V. Osterhout.

(Laboratory of Plant Physiology, Harvard University, Cambridge, Mass. U. S. A.)

(Eingegangen am 9. Juli 1914.)

Der Verfasser hat beobachtet, daß der Temperatur-Koeffizient des elektrischen Leitvermögens beträchtlich höher ist im lebenden als im toten Gewebe der Laminaria saccharina. Bemerkenswert wird diese Beobachtung dadurch, daß sie einen neuen und überzeugenden Beweis der wichtigen Tatsache liefert, auf die sich frühere Arbeiten stützten[1]), nämlich: daß, wenn ein elektrischer Strom durch lebendes Gewebe fließt, er sowohl durch die lebenden Zellen selbst als auch durch die Interzellularsubstanz fließt, die die Zellen trennt.

Es ist bewiesen worden[2]), daß das Leitvermögen eines Gewebes zunimmt, sobald das Gewebe getötet wird. Als Erklärung hierfür könnte man annehmen, daß das lebende Protoplasma keinen Strom leitet, daß es im toten Zustand aber zum Leiter wird. Diese Annahme erweist sich jedoch als falsch, sobald dem Seewasser, in dem das Gewebe sich befindet, Calciumchloridkrystalle hinzugefügt werden. Es vermindert sich alsdann das Leitvermögen des Gewebes, obwohl das Leitvermögen der in der Zwischensubstanz zwischen den Zellen befindlichen Lösung zunimmt. Andererseits nimmt das Leitvermögen des toten Gewebes zu, wenn letzteres in eine ähnliche Lösung gelegt wird, selbst wenn die Tötung des Gewebes

---

1) Osterhout, Science N. S. **35**, 112, 1912; **36**, 350, 1912; **37**, 111, 1913. — Plant World **16**, 129, 1913.

2) Osterhout, Science N. S. **35**, 112, 1912.

auf eine Weise bewirkt wurde, die augenscheinlich keine Veränderung in der Zwischensubstanz hervorruft. Die von Calcium auf das Leitvermögen des lebenden Gewebes hervorgerufene Wirkung hat also ihren Angriffspunkt in den lebenden Zellen und nicht in der Intercellularsubstanz; und da diese Wirkung Verminderung des Leitvermögens bedeutet, so muß man annehmen, daß das lebende Protoplasma in diesem Falle den Strom leitet.

Eine Untersuchung des Temperatur-Koeffizienten führt auch zu einer ähnlichen Annahme. Die Veränderung im Temperatur-Koeffizienten nach dem Tode, die wir gleich besprechen werden, darf Veränderungen in den Zellen oder in der Zwischensubstanz oder in beiden zugeschrieben werden. Wird der erste oder der letzte Fall vorausgesetzt, so muß man auch annehmen, daß das lebende Protoplasma den Strom leitet. Nur im Falle, daß Veränderungen in der Zwischensubstanz allein für Veränderungen im Temperatur-Koeffizienten verantwortlich sind, kann man annehmen, daß das lebende Protoplasma der Zellen den Strom nicht leitet[1]). Diese Ansicht läßt sich von zwei Seiten betrachten.

Erstens ist es sehr zweifelhaft, ob in der Intercellularsubstanz irgendwelche tiefgreifende Veränderungen hervorgerufen werden durch Tötungsmittel, wie z. B. Chloroform, Licht, Temperaturzunahme bis zu 45° C, Verdünnung des Seewassers, teilweises Vertrocknen der Pflanzen oder Stehenlassen der Pflanzen im Seewasser (im Laboratorium) bis sie absterben. All diese Mittel aber verändern den Temperatur-Koeffizienten auf genau dieselbe Weise.

Andererseits ist es ganz klar, daß eingreifende Veränderungen mit dem Protoplasma vorgehen, wenn es durch obige Mittel getötet wird, und man kann annehmen, daß der Wechsel im Temperatur-Koeffizienten Veränderungen im Protoplasma zuzuschreiben ist.

---

[1]) Man könnte diesen Schluß möglicherweise verwerfen, indem man annimmt, daß die Zelle im lebenden Zustand den Strom nicht leitet; im toten Zustand den Strom jedoch leitet und dann einen geringeren Temperatur-Koeffizienten besitzt als den der Zwischensubstanz. Dies ist aber höchst unwahrscheinlich: der Temperatur-Koeffizient der Zwischensubstanz ist offenbar so gering wie der des Seewassers.

In einem früheren Aufsatz[1]) wurde die Methode dargelegt, wie der elektrische Widerstand des Gewebes gemessen wurde. Der Apparat besteht aus zwei, in Hartgummi eingeschlossenen Elektroden. Der Strom wird von der einen Elektrode auf die Entfernung von 10 mm durch Seewasser zum Gewebe abgeleitet, das einen 5 cm langen, aus Scheiben zusammengesetzten Zylinder in Form einer Geldrolle bildet. Nachdem der Strom durch das Gewebe geflossen ist, wird er wieder durch Seewasser auf die Entfernung von 10 mm zur anderen Elektrode abgeleitet.

Wird das Gewebe entfernt und werden die zwei die Elektroden enthaltenden Hartgummikolben einander genähert, so ist es möglich, den Widerstand des mit Seewasser gefüllten Apparates zu messen. Der Strom wird dann auf die Entfernung von ungefähr 20 mm Seewasser von einer zur anderen Elektrode abgeleitet. Auf diese Weise erhielt man folgende Ergebnisse, von denen jedes einzelne die Durchschnittszahl von 3 bis 5 Bestimmungen gibt:

Apparat Nr. 0	Widerstand	bei $10^0 = 285$	Temp.-Koef. $= 1{,}261$
	„	„ $20^0 = 226$	
„ „ 1	„	„ $10^0 = 305$	„ „ $= 1{,}260$
	„	„ $20^0 = 242$	
„ „ 3	„	„ $10^0 = 300$	„ „ $= 1{,}260$
	„	„ $20^0 = 238$	
„ „ 4	„	„ $10^0 = 312$	„ „ $= 1{,}258$
	„	„ $20^0 = 248$	

Ein 5 cm langer Glaszylinder von 20 mm innerem Durchmesser wurde mit Seewasser angefüllt und auf dieselbe Art wie der Gewebezylinder in den Apparat eingesetzt. Dieser Zylinder entsprach im Durchmesser und auch in der gewöhnlichen Länge ungefähr dem Gewebezylinder. Durch Subtraktion des Widerstandes des Apparates ergab sich folgendes Resultat (Durchschnitt dreier Bestimmungen):

Widerstand bei 10^0	$392 - 305 = 87$	Temp.-Koef. $= 1{,}261$.
„ „ 20^0	$311 - 242 = 69$	

Dieses Ergebnis kann als Temperatur-Koeffizient des in diesem Apparat gemessenen Seewassers angenommen werden. Außerdem stimmt es ziemlich überein mit dem Koeffizient der

[1]) Osterhout, l. c.

von **Kohlrausch** und **Holborn** aufgestellten Formel einer 5 %igen NaCl-Lösung[1]). In der Formel

$$K_t = K_0 (1 + ct + c' t^2)$$

gibt t die Temperatur in Zentigraden an, K_0 das Leitvermögen bei 0° C, K_t das Leitvermögen bei einer gegebenen Temperatur Zentigrad, während c und c' Konstanten sind. In 5 %igem NaCl $c = 0{,}0295$ und $c' = 0{,}000\,103$.

Demnach ergibt sich:

$$\left.\begin{aligned} K_{10} &= K_0\,(1{,}3053) \\ K_{20} &= K_0\,(1{,}6312) \end{aligned}\right\}\ \text{Temp.-Koef.} = 1{,}250\,.$$

Bei der Bestimmung des Temperatur-Koeffizienten kann man Widerstand oder Leitvermögen zu Hilfe nehmen.

Bestimmungen des Widerstandes in Zylindern toten Gewebes ergaben folgende Resultate. (Der Widerstand des Apparates wurde in jedem Fall subtrahiert.)

Widerstand bei	10°	440 — 305 = 135	Temp.-Koef. = 1,261
" "	20°	349 — 242 = 107	
" "	10°	441 — 310 = 131	" " = 1,260
" "	20°	350 — 246 = 104	
" "	10°	417 — 310 = 107	" " = 1,259
" "	20°	331 — 246 = 85	

Dies beweist, daß totes Gewebe denselben Temperatur-Koeffizient wie Seewasser hat.

Bei Zylindern lebenden Gewebes ergaben sich folgende Resultate (der Widerstand des Apparates wurde subtrahiert):

Widerstand bei	10°	1356 — 285 = 1071	Temp.-Koef. = 1,340
" "	20°	1025 — 226 — 799	
" "	10°	1230 — 300 = 930	" " = 1,317
" "	20°	944 — 238 = 706	

Gewebe mit geringerem Widerstand hat einen geringeren Temperatur-Koeffizienten. Dies ergab sich als Allgemeinregel in einer beträchtlichen Reihe von Messungen. Je mehr sich der Widerstand dem Absterbepunkt näherte, desto mehr stimmte der Temperatur-Koeffizient mit dem des toten Gewebes überein (1,260).

[1]) Leitvermögen der Elektrolyte. S. 195.

Um das Anwachsen des Temperatur-Koeffizienten durch irgendeinen mechanischen Faktor auszuschließen, während der Widerstand sich erhöhte, wurde der Widerstand im toten Gewebe auf den im lebenden Gewebe erhöht mittels eingelassener Scheiben aus schlechtleitendem Material. Der Temperatur-Koeffizient blieb wie zuvor (1,260).

Es ist daher als sicher anzunehmen, daß im lebenden Gewebe der Temperatur-Koeffizient bedeutend höher ist als im toten. Infolgedessen ist der Temperatur-Koeffizient auch höher, wenn sich die Pflanzen im besseren Zustand befinden. Durch längeres Stehen im Laboratorium verlieren sie an Lebenskraft, ihr Widerstand nimmt ab und ihr Temperatur-Koeffizient verringert sich. Temperatur-Koeffizienten von fünf Bestimmungen von Gewebe im guten Zustand ergaben: 1,320, 1,340, 1,336, 1,328, 1,331, mit einem Durchschnitt von 1,331.

Aus obigem ersieht man, daß der Temperatur-Koeffizient der Intercellularsubstanz ungefähr gleich ist mit dem des Seewassers (1,260). Ist demnach im lebenden Gewebe, das aus Intercellularsubstanz und lebendem Protoplasma besteht, der Temperatur-Koeffizient 1,331, so muß auch der Temperatur-Koeffizient des lebenden Protoplasmas 1,331 bedeutend übersteigen, um den allgemeinen Durchschnitt von Intercellularsubstanz und Protoplasma auf diese Zahl zu erhöhen.

Die Ursache dieses hohen Temperatur-Koeffizienten folgt aus der Tatsache, daß Temperaturwechsel die Viscosität (oder irgendeinen Faktor, der den Durchgang von Ionen beeinflußt) im lebenden Protoplasma schneller verändert als im toten Protoplasma oder in der Intercellularsubstanz. Dies ergibt sich natürlicherweise, da im toten Protoplasma und in der Intercellularsubstanz die Stabilität bedeutend größer ist als im lebenden Protoplasma.

Aus den vorhergehenden Beobachtungen ist es ersichtlich, daß das Protoplasma im lebenden Zustand für Ionen permeabel ist.

Untersuchungen über Ferment- und Antiferment-wirkungen des Serums.

Von

Georg Hälsen.

(Aus dem Institut für Krebsforschung in Heidelberg.)

(Eingegangen am 15. Juli 1914.)

Seitdem Abderhalden durch seine Methoden zum Nachweise proteolytischer Fermente der Serumforschung neue Gesichtspunkte gegeben hat, haben sich eine große Reihe Forscher mit diesen Gebieten beschäftigt, die angegebenen Methoden selbst einer genauen Nachprüfung unterzogen, Fehlerquellen aufgedeckt und ihre Zuverlässigkeit an großen Versuchsreihen erprobt, sowie die theoretischen Voraussetzungen einer Kritik unterzogen. Der Streit über die verschiedenen Fragen ist auch heute noch nicht entschieden.

Da verschiedene Forscher über unspezifische Resultate berichten und daher der Methode jeden klinischen Wert absprechen mit dem Hinweis darauf, daß unspezifische quantitative Differenzen im Fermentgehalt vorlägen, sollte auf Veranlassung von Dr. Fränkel, hier durch Paralleluntersuchungen festgestellt werden, inwieweit bei positiver Abderhaldenreaktion auch eine Steigerung sonstiger proteolytischer Fermente oder Antifermente im Serum nachweisbar war. Die Arbeit stellt also eine Ergänzung der früheren, meist mit dem Dialysierverfahren angestellten Untersuchungen aus der serologischen Abteilung des Krebsinstitutes dar, über deren Resultate Deetjen, Fränkel, Halpern, Gumpertz und andere in früheren Arbeiten berichtet haben. Ich kann deshalb hier auf diese Arbeiten verweisen, sowie auf das reichhaltige Literaturverzeichnis, das Abderhalden in seinem Buche über die Abwehrfermente gibt.

Mit der optischen Methode hat insbesondere bei Gravidität Rübsamen gute Erfolge zu verzeichnen, indem er unter 62 Versuchen kein Fehlresultat erhielt, also mit Abderhaldens Ergebnissen ganz überein-

stimmt, das Dialysierverfahren wandte er 94 mal an und hatte ebenso glänzende Resultate. Zwei Carcinomsera und ein männliches Serum ergaben mit Placenta keine positive Reaktion. Anders berichten Freund und Brahm über die optische Methode und ihren Vergleich mit dem Ausfall der Ninhydrinreaktion. Unter 134 Fällen deckte sich das Ergebnis der Polarisation 97 mal mit dem klinischen Befund und unter 99 Kochproben 66 mal. Diese Forscher geben den verschiedenen Peptonen die Schuld für die Versager, die mit verschiedenen Seren ungleichmäßig schnell reagieren sollen. Außerdem empfehlen sie, die Drehung längere Zeit zu verfolgen, da oft erst nach 48 Stunden ein geringer Abbau nachweisbar sei. 11 Sera änderten schon allein in der Serumkontrolle ihre Drehung um 0,05 bis 0,07°. Bei den mit beiden Methoden verglichenen 92 Seren fanden sie 61 mal Übereinstimmung. Auch spätere Untersuchungen brachteu ihnen keine besseren Resultate.

Kjaergaard hat mit der optischen Methode auch keine spezifischen Erfolge sehen können. Er fand schon mit dem Serum von Normalen, Nichtgraviden Drehungen von 0,03 bis 0,04° in 24 Stunden. Er möchte Drehungen von 0,05° nicht für Fehler halten, sondern für den Ausdruck von Anwesenheit peptolytischer Fermente in jedem Serum. Interessant ist auch bei diesem Autor, daß bei Frauen 1 bis 2 Tage vor der Menstruation im Polarisationsrohr Werte abgelesen werden konnten, die an der Grenze 0,05° und darüber lagen, die aber wieder absanken, wenn man 10 Tage postmenstruell untersuchte.

Neuerdings haben Thar und Kotschneff ähnliche unspezifische Resultate erzielt. Einerseits beobachteten sie unter 20 Gravidenseren 14 mal Drehungen von mehr als 0,05°, 6 mal weniger, andererseits sahen sie bei 6 Normalen 3, die 0,05° und darüber drehten, 2 mit 0,04° und 1 mit 0,03° Drehungsänderung. Im Eisschrank bemerkten sie keine Änderung der Anfangsdrehung, mit Seidenpepton drehten 2 um 0,03°.

Da unser Institut im Besitze eines ausreichenden Polarisationsapparates ist, so sollte einerseits die Brauchbarkeit der optischen Methode festgestellt werden, vor allem aber andererseits die bei uns erhaltenen Resultate der Dialysiermethode mit der optischen verglichen und daneben andere Fermentmethoden zum Vergleich mit der Abderhaldenschen Reaktion herangezogen werden.

Zunächst möchte ich die mit dem optischen Verfahren gewonnenen Resultate mitteilen.

Ich hielt mich bei der Bereitung der Peptone an die Vorschriften Abderhaldens, wie sie insbesondere in den „Abwehrfermenten" 3. Aufl. 1913 mitgeteilt sind. Zur Verarbeitung wurden uns aus der hiesigen Frauenklinik Placenten freundlichst zur Verfügung gestellt, ebenso Carcinome und tuberkulöse Lungen aus dem pathologischen Institut. Die Placenten wurden möglichst bald nach der Geburt von den Eihäuten befreit, dann innerhalb eines Haarsiebes mit den Fingern in

kleine Stücke zerdrückt, während das Sieb in einer Emailschale mit Wasser stand. Hierdurch wurde erreicht, daß die Gefäßbäume, die beseitigt werden sollen, möglichst bis zu den kleinsten Ästen zusammenbleiben, was bei Zerschneiden nicht geschieht. Durch Zerdrücken mit den Fingern werden die Zotten schon in großer Anzahl von den Gefäßbäumen abgerissen, bleiben aber in dem Haarsieb zurück, und sind als das eigentliche spezifische Substrat verwendbar. Auf diesen Punkt macht Lange bei seinen exakten Arbeiten besonders aufmerksam, der betont, daß man nicht etwa in offenem Gefäß unter fließendem Wasser die feinen Teilchen fortschwemmen darf. Auf die geschilderte Weise lassen sich die Stücke auch schnell und leicht von den Blutkoagula befreien. Unter mehrfachem Wechseln des Wassers in der Waschschüssel, in die das Haarsieb hineingestellt wurde, suchte ich die Gefäßbäume heraus, streifte von ihnen mit den Fingern die Zotten möglichst herunter, entfernte auch noch eventuelle Blutkoagula und dunkle Gewebstücke, sowie die feinsten Gefäßenden, die noch einigermaßen sichtbar waren, bis das Ganze eine gleichmäßige, rosafarbene Masse bildete. Dieser Brei wurde zuletzt in einer Flasche mit physiologischer Kochsalzlösung eine halbe bis ganze Stunde lang in der Schüttelmaschine geschüttelt, abgegossen und nochmals mit neuer Kochsalzlösung geschüttelt. So erreichte ich bei dem Arbeiten der letzten Zeit, daß in relativer Kürze der Placentabrei schneeweiß wurde. Im Anfang der Herstellung gelang es oft erst bei vielstündigem Aussuchen nur der feinsten Zotten, eine gleichmäßige einigermaßen weiße Masse zu bekommen, wobei naturgemäß wenig Material übrigblieb.

Dieser Brei wurde dann nach Aufkochen und Ausdrücken zwischen Fließpapier mit der dreifachen Menge 70 $^0/_0$iger Schwefelsäure versetzt und genau drei Tage stehen gelassen, dann mit der 10fachen Menge destilliertem Wasser unter Eiskühlung verdünnt und möglichst schnell mit Bariumhydrat neutralisiert. Diese Maßnahme nimmt viel Zeit in Anspruch, da die Neutralisation peinlichst genau sein soll. Um Fäulnis zu verhüten, wurde alles mit Toluol versetzt. Das Einengen der filtrierten Lösung des Hydrolysats ging bei 40° unter vermindertem Druck vor sich, bis aus dem Ganzen ein gelblicher, sirupöser Rückstand verblieb, der in heißem Methylalkohol aufgenommen

und durch ein Filter in eiskaltem Äthylalkohol ausgefällt wurde. Nachdem sich der Niederschlag, der das Pepton darstellt, abgesetzt hatte, wurde dieser zentrifugiert, nicht filtriert, weil bei letzterem Verfahren immer ein Teil in den Filterporen zurückbleibt, und das Material leicht durch die Fasern des Filters nach dem Trocknen verunreinigt wird. Der zentrifugierte Niederschlag wurde im Vakuumexsiccator getrocknet. Leider entspricht die resultierende Menge Peptons nur wenig der aufgewendeten Zeit und Mühe, denn aus einer Placenta — und ich habe deren 12 verarbeitet — erhielt ich ca. $^1/_4$ g Peptonpulver, das in $5^0/_0$iger Lösung für gerade 5 Untersuchungen reicht.

Für Carcinompepton verarbeitete ich Carcinome verschiedener Herkunft. Von 2 Magencarcinomen konnte ich die sehr reichlichen Lebermetastasen, die z. T. faustgroße Stücke bildeten, verwenden, dann ein primäres Lebercarcinom. Die Krebsstücke wurden sorgfältig herausgeschnitten und von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit, fein zerkleinert, gewässert und ebenso behandelt wie die Placenta. Die sehr hochgradig veränderte Lunge wurde von Bindegewebe und gesunden Partien soweit mikroskopisch überhaupt möglich befreit und nach Wässerung genau wie die anderen Gewebe verarbeitet. Die sorgfältige Reinigung des Materials von Blut und Bindegewebe geschieht von der Überlegung aus, daß nur ganz spezifisches Organeiweiß zur Fahndung auf spezifische Fermente benutzt werden kann. Bindegewebe und Erythrocyten werden bei verschiedenen Erkrankungen eingeschmolzen und beseitigt, so bei Tuberkulose, Carcinom, Entzündungen, Hämatomen u. a. Die Richtigkeit der Annahme von spezifischen Fermenten vorausgesetzt, würden dann nennenswert blut- und bindegewebhaltige Substrate von allen diesen Seren abgebaut werden können. Das spezifische Substrat, das „blutfremd“ im Blute zur Bildung bzw. Mobilisierung von darauf eingestellten Fermenten Anlaß geben soll, sind bei der Placenta die Zotten, die vom Ei ausgehen, bei Carcinom die Krebszellen und -nester, bei der Tuberkulose der Lunge die Tuberkel, die verkästen Herde und die nächste Umgebung von Kavernen.

Eine völlige Isolierung des spezifischen Materials ist bei keinem der drei genannten Substrate möglich. Am reinsten

vielleicht noch bei dem Placentargewebe, aber auch dabei sind die kleinsten Gefäßenden, die den Zotten benachbart sind, von den Zotten selbst schwer oder gar nicht zu trennen. Bei der Bereitung des Materials zur optischen Methode kommt nun ein geringer Bestand an unspezifischen Stoffen weniger in Betracht als bei dem Dialysierverfahren. Denn bei diesem, wo nur ein kleiner, mit der Pinzette faßbarer Teil von $^1/_2$ bis 1 g zu der Serummenge gesetzt wird, ist es naturgemäß von Bedeutung, ob einmal ein Quantum mit viel Zotten und wenig Bindegewebe oder ein andermal Material in umgekehrtem Verhältnis zugefügt wird. Je nach diesen Mengenverhältnissen kann der Ausfall der Reaktion verschieden sein. Erst neuerdings haben Flatow und Kjaergaard auf willkürlichen Ausfall der Reaktion durch Variieren der Organmengen hingewiessn.

Bei der Peptondarstellung tritt eine gleichmäßige Durchmischung des gesamten Materials ein, so daß zu jedem Versuch stets die gleiche Menge spezifischen Substrats verwandt wird. Dieses muß nur so stark vertreten sein, daß es eine Drehungsänderung zu geben vermag, während der Bindegewebe- und Blutanteil unter dieser Schwelle bleiben muß. Eine wichtige Fehlerquelle des Dialysierverfahrens verliert also bei der optischen Methode etwas an Bedeutung.

Bei meinen Versuchen mischte ich im Reagensglas 1 ccm der 5%igen Peptonlösung mit 1 ccm Serum und 0,4 bzw. 0,2 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung und füllte diese Mischung in ein kurzes Polarisationsrohr mit Wassermantel (nach Abderhalden). Das Serum wurde steril entnommen und jedesmal auf Hämoglobin spektroskopisch untersucht. Nur hämoglobinfreies Serum wurde verwendet. Außerdem kann zum Polarisieren nur absolut klares und helles Serum genommen werden, da sonst das Ablesen unmöglich oder schwierig und ungenau ist. Dieser Punkt scheint mir die Verwendungsmöglichkeit der Methode in der Praxis erheblich einzuschränken, da es oft nicht möglich ist, brauchbares Serum zu erhalten. Die beschickten Röhrchen kamen in den Brutschrank von 37° und wurden erstmalig nach $^1/_2$ bis 1 Stunde untersucht. Unser Halbschattenapparat (Schmidt und Hänsch-Berlin) gestattet Ablesungen von 0,01°, entspricht also den Bedingungen, die zur Vornahme der Untersuchungen von Abderhalden ge-

stellt werden. Da der Apparat außerdem im Brutschrankzimmer aufgestellt ist, das durchschnittlich eine Temperatur von 32 bis 35° besitzt, so dürfte ein Fehler durch Abkühlung des dem Brutschrank entnommenen Röhrchens bei der Untersuchung nicht sehr in Frage kommen. Aus den Einzelablesungen, deren Differenzen meistens nicht mehr als 0,02 bis 0,03° betrugen, wurde das Mittel gezogen; allerdings kam es auch z. B. bei sehr gelb gefärbten Seren vor, daß die Schwankungen der Einzelablesungen größer waren. Trotz reichlicher Übung waren manchmal auch die aus den Durschschnitten gewonnenen Ablesungen ungenau und auseinanderliegend, ohne daß in der Serum-Peptonmischung ein Grund gefunden werden konnte. Es spielen da jedenfalls im subjektiven Befinden des Untersuchers liegende Umstände mit, Wechsel in Dunkeladaptionsfähigkeit, zufällige Blendung, Indispositionen u. a. Da das Arbeiten am Polarisationsapparat eine erhebliche Anstrengung des Auges bedeutet, um die geringen Helligkeitsunterschiede des Halbschattenfeldes zu erkennen, so wird sich dieser Faktor als Fehlerquelle nicht ausschalten lassen.

Die Ablesungen erfolgten nach der erstmaligen Entnahme anfangs alle 2 bis 3 Stunden, im allgemeinen ca. 24 Stunden lang, in Fällen jedoch, die dann an der Grenze eines positiven Ausschlags, der von Abderhalden auf eine Drehungsänderung von 0,05° angegeben wird, lagen, wurde auch länger untersucht. Es war dann aber bei einer Anzahl von Seren ein Fortschreiten der Drehungsänderung auch mit unspezifischem Substrat nachzuweisen. Dies entspräche den Befunden von Kjaergaard, der eine spezifische Änderung nur als Steigerung eines allgemein proteolytischen Vermögens ansieht, das bei genügend langer Beobachtung oft gefunden werden kann. Bei normalem Serum war auch nach dreitägigem Beobachten keine Änderung zu bemerken. Serumkontrollen von in der Peptonmischung drehenden Seren änderten sich nie, mit Ausnahme eines Serums, das die Drehung um 0,03° änderte, ebenso auch nicht die Peptonlösung allein. Inaktivierte Sera zeigten mit derselben Peptonmischung eine stärkere Anfangsdrehung als die aktiven, was den Untersuchungen von Mießner und Immisch entspricht. In den ersten 4 bis 6 Stunden war meist keine Änderung zu bemerken, diese setzte erst nach 6 bis 12 Stunden ein und er-

reichte ihren tiefsten Punkt nach ca. 20 bis 22 oder 24 Stunden, um dann manchmal wieder anzusteigen. Wenn Trübungen auftraten, wie es trotz peinlichst sterilen Arbeitens öfter vorkam und diese sich später absetzten, so war meist eine stärkere Drehungsänderung eingetreten und beim Umschütteln zeigten sich Präcipitate. Solche Drehungsänderungen, die vielleicht auf bakterielle Zersetzung zurückzuführen sind, zu verwerten, dürfte nicht gut angehen, diese Sera sind im Gegensatz zu Freund und Brahm von der Beurteilung auszuschließen.

Tabelle I.

(Zusammenstellung der Ergebnisse der optischen Methode nach Substraten.)

Nr.	Diagnose	Tuberkulöse Lunge	Carcinom	Placenta
1755	Tuberk. pulm. incip.	0,05		
1775	Mediastinaltumor	0,00		
1815	Sarcoma femoris	0,04		
1814	Prostatacarcinom	0,00		
1833	Atherosklerose	0,00		
1825	normal	0,02		
1849	Carc. uteri	0,06		
1877	Metropathia climact.	0,12		
1884	Carc. oesophagi	0,02		
1904	Tuberc. pulmon.	0,03		
1905	do.	0,00		
106	do.	0,00		
127	Gravidität 9 Monate	0,06		0,05
163	„ 8 „	0,01		0,02
157	Carc. ventric.		0,00	
188	Angina, ulcera	0,00	0,00	
205	Carc. recti recid.	0,00	0,07	0,03
212	Lebercarcinom	0,05	0,07	
230	normal	0,00	0,00	0,01
222	Lebercarcinom		0,06	0,00
255	Epitheliome		0,05	0,06
280	Carc. linguae		0,00	0,02
303	Gravidität 9 Monate	0,00		
309	Affectio apic.	0,08	0,02	
340	Gravidität 9 Monate			0,10
351	Carc. vulvae	0,01	0,08	
387	Abortus 2 Monate		0,03	0,06

In der Tabelle I sind neben der klinischen Diagnose in den drei Rubriken die drei Peptonarten verzeichnet, die zur Untersuchung kamen. In der ersten Reihe sind die Resultate mit tuberkulöser Lunge, in der zweiten mit Carcinom und in der dritten mit Placenta eingetragen. Aus der Tabelle geht hervor, daß eine Anzahl Sera nicht mit homologem Pepton un-

tersucht werden konnte. Unter den angeführten 27 Seren sind 16 mit homologem Pepton untersucht, zwei normale mit 1 bzw. 3 Substraten, außerdem 6 mit heterologem Material und 3 mit klinischen Erkrankungen ohne Beziehung zu einem der drei vorgelegten Peptone. Bei den 16 ersteren fand ich bei 10 Patientenseren mit dem entsprechenden Pepton einen Drehungsausschlag um mindestens 0,05°, was als positiv zu bezeichnen wäre, die andern 6 lagen unter dieser Grenze. Die beiden Normalsera wiesen keine oder nur ganz geringe Unterschiede auf und bildeten so eine Kontrolle dafür, daß die Peptonlösungen nicht schon für sich mit einem Serum ihre Drehung änderten. Die Seren von Arteriosklerose und Angina (Nr. 1823 und 188) zeigten ebenfalls keine Änderung ihrer Anfangsdrehung, dagegen hatte das Serum der Patientin Nr. 1877 einen starken Ausschlag mit Lungenmaterial: der klinische Lungenbefund zeigte über der rechten Spitze eine breite deutliche Dämpfung und hauchendes Exspirium.

Unter den 8 positiven, mehrfach untersuchten Seren wiesen drei (Nr. 127, 212 und 255) auch mit anderem Pepton positive Drehungen auf. Weder war bei Serum 127 und 212 klinisch eine Lungentuberkulose, noch bei 255 eine Gravidität vorhanden. Hier ist der Ausschlag also unspezifisch. Unter den 6 mit heterologischem Material untersuchten Seren reagierte eins (1849) mit Lungenpepton positiv, die Spenderin hatte auch über der linken Lunge klinisch nachweisbare Erscheinungen (nichtklingendes Rasseln), während die anderen ohne Lungenerscheinungen waren.

Ich konnte also bei meinen Versuchen die guten Erfolge Abderhaldens und anderer nicht erzielen, indem von den 27 Seren 21 dem klinischen Befund entsprachen und 6 nicht.

Auch Abderhalden stellt es des öfteren als wünschenswert hin, daß die Resultate beider Methoden verglichen werden sollen, um so Kontrollen für die Richtigkeit sowohl der Methoden als auch ihrer Voraussetzungen zu erhalten; deshalb war es interessant, die von mir erhaltenen Ausschläge an dem gleichzeitig in unserem Institut vorgenommenen Dialysierverfahren zu messen. Es sei hervorgehoben, daß bei diesem letzteren

die Vorschriften Abderhaldens peinlichst genau befolgt wurden, daß die Organe insbesondere sorgfältigst zubereitet und in den Kontrollen, die stets mitgeführt wurden, nie die Ninhydrinreaktion ergaben. Die Dialysate wurden immer sowohl in gewöhnlichen Reagensgläsern als auch in solchen aus Jenaer Glas angesetzt. Nach den Ergebnissen von Deetjen und Fränkel aus unserem Institut sind die Glasarten von Bedeutung und Abderhalden hat auch in seiner neuesten Ausgabe die Verwendung von Jenaer Röhrchen anerkannt und empfohlen. Ich benutzte von den Resultaten der Dialysierproben die mit Jenenser Glas erhaltenen, die mir von Dr. Fränkel zur Verfügung gestellt wurden.

Da wir nur relativ selten Seren in solcher Menge zur Verfügung haben, daß beide Methoden mit entsprechenden Kontrollen angesetzt werden können, so bin ich leider nicht in der Lage, eine größere Anzahl Seren gegenüberzustellen, es ist deshalb Zufall, daß unter den gleichzeitig untersuchten die Mehrzahl von Seren negative Resultate gab. Der Ausfall der Dialysiermethode war mir im allgemeinen vor den Ablesungen nicht bekannt.

Tabelle II.

Vergleich der optischen mit der Dialysiermethode.

Nr.	Diagnose	Carcinom		Placenta		Tuberkulöse Lunge	
		O.	D.	O.	D.	O.	D.
1904	Tbc. pulmon.					—	+
1905	do.					—	+
163	Gravidität 8 Monate			—	—	—	—
157	Carc. ventric.	—	±				
188	Angina, ulcera	—	—			—	±
205	Carc. recti	+	—	—	—	—	—
212	Lebercarcinom	+	—			±	±
230	normal	—	—	—	—	—	—
222	Lebercarcinom	+	—	—	—		
255	Epitheliom	+	+				
280	Carc. ling.	—	±	—	—		
303	Gravidität 9 Monate					—	—
309	Affect. apic.	—	—			+	+
340	Gravidität 9 Monate			+	+		
351	Carc. vulvae	+	+			—	—
387	Abortus 2 Monate	—	—	+	+		

In der Tabelle bedeutet + das Auftreten eines bläulichen Farbtones verschiedener Intensität beim Kochen des Dialysates

und eine Drehungsänderung von 0,05° und darüber beim Polarisieren, + eine ganz geringe Farbenänderung ohne ausgesprochen bläulich zu sein, bzw. bei dem Serum 212 ein Schwanken der Ablesungen um 0,05° durch eine schon im Beginn vorhanden gewesene geringe Trübung, die das Ablesen sehr erschwerte, so daß diese Drehungsänderung vielleicht nur Ablesungsfehler ist, — bedeutet des Fehlen irgendeines Farbtones und Drehungsänderung einschließlich der innerhalb der Fehlergrenzen liegenden Änderungen bis zu 0,04°. Jede der drei Rubriken: Carcinom-, Placenten- und tuberkulöses Lungensubstrat enthält im Falle der doppelten Untersuchung links, in der Spalte O., das Resultat der optischen und rechts, in der Spalte D., das der Ninhydrinreaktion. Die angeführten 16 Seren zeigen 28 Einzeluntersuchungen. Unter diesen entsprechen 20mal beide Methoden sich völlig, 3mal ist die optische negativ, während das Dialysierverfahren einen zweifelhaften Ausfall zeigt. Außerdem waren 5mal die Resultate verschieden; bei 2 Lungentuberkulosen zeigte das Dialysierverfahren mit entsprechendem Antigen einen fermentativen Abbau, während beim Polarisieren keine Drehungsänderung erfolgte, und 3mal waren Drehungsänderungen nachzuweisen, während das Kochverfahren bei sicherem Carcinom versagte.

Sieht man sich die Tabelle auf die homologen Substrate der einzelnen Seren an, die nur einmal nicht angewendet wurden, so ergibt sich, daß unter 15 Seren 8mal gleichlautende Ergebnisse, von denen 7 mit dem klinischen Befund harmonieren und 1 nicht, und 7mal verschiedene Ausschläge erzielt wurden. Alle Substrate zusammengenommen entsprachen 19 unter den 20 gleichlautenden Resultaten der klinischen Diagnose.

Vor kurzem riet Abderhalden im Anschluß an das Verfahren Grützners, die proteolytischen Fähigkeiten neben den genannten zwei Methoden durch Verwendung gefärbter Organstücke zu prüfen. Grützner hatte zum Nachweis von Pepsin carmingefärbte Fibrinflocken verwandt. Je nach der Stärke der aufgelösten Farbe, die auf eine Verdauung des Fibrins deutete, konnte die proteolytische Kraft der untersuchten Lösung und auch der antitryptischen Wirkung des Blutserums abgelesen

werden. Abderhalden schlug vorläufig vor, die genau wie zum Dialysierverfahren vorbereiteten Organstücke in einer ammoniakalischen Carminlösung 24 bis 48 Stunden zu färben und dann gründlich auszuwaschen, bis kein Farbstoff mehr an das Waschwasser abgegeben wurde. Einige Teilchen, ca. $^1/_2$ bis 1 g, werden dann in kleinen Reagensgläsern mit 1 bis 2 ccm Serum und Toluol beschickt in den Brutschrank gestellt und beobachtet, ob das Serum gerötet wird, was auf einen fermentativen Abbau schließen lassen dürfte. Bei meinen Versuchen, die allerdings nur eine geringe Anzahl Seren umfaßten, konnte ich öfters sehen, daß auch Nichtgravidensera das gefärbte Placentagewebe angriffen und den Farbstoff herauszogen, so daß das Serum rot wurde, während andererseits Gravidenserum keine oder geringe Rötung zeigte. Wie auch Abderhalden selbst sagt, ist die rote Carminlösung nicht ganz geeignet, da der Farbstoff zu leicht auch ohne „Abbau" abgegeben wird, und er empfiehlt die Versuche auch mit anderen Farben, z. B. Spritblau, die ich nicht weiter verfolgt habe.

Dagegen versuchte ich einen anderen Weg zum Nachweise und bequemen Registrieren von Fermentwirkungen, angeregt durch die schon seit langem gebrauchte Plattenmethode zum Nachweise antiproteolytischer Fermente und insbesondere durch die Farbplattenmodifikation von Kantorowicz und eine andere von Brieger und Schwalm. Da diese Methoden den Vorzug großer Einfachheit haben und leicht objektiv registrierbar sind, suchte ich „spezifische Platten" herzustellen. Peptonlösungen, wie ich sie zur optischen Methode brauchte, wären wohl geeignet gewesen, waren aber zu kostspielig zu den Versuchen. Gelatineplatten sind nicht brauchbar, da sie keine Brutschranktemperatur aushalten und andererseits selbst ein unspezifisches Substrat für im Serum enthaltene gelatinolytische Fermente darstellen. Ich nahm daher Agar, von dem nur ganz geringe Zusätze nötig sind, um eine erstarrende Schicht zu bilden. Um Placentareiweiß zu bekommen, wusch ich eine Placenta schnell möglichst blutfrei, zerkleinerte sie und ließ sie mit physiologischer Kochsalzlösung über Nacht stehen. So ging fast alles Blut in Lösung, allerdings auch etwas Eiweiß. Dieses Wasser benutzte ich nicht, sondern erst die nochmals auf das Placentagewebe gegossene Kochsalzlösung, die dann mehrere Tage stehen blieb.

Wenn ja auch ein Teil des Eiweißes so der Autolyse verfällt, so geht doch ein Teil in Lösung. Das Filtrat betrug ungefähr 2 Liter, dieses wurde im Vakuum bei ca. 40° auf 200 ccm eingeengt. Von dieser Lösung wurden 15 ccm im Wasserbade auf 45° gebracht und erhalten, während vorher Agar (2%) durch Erhitzen auf 98 bis 100° verflüssigt wurde und ebenfalls bei 45° erhalten, wo es noch flüssig ist. 5 ccm hiervon wurden dann mit den 15 ccm Eiweißlösung versetzt und nach Hinzufügen von mehreren Tropfen Karbolfuchsinlösung in heißem Trichter durch etwas Watte filtriert. Diese Mischung wurde dann auf vorher über einer Flamme erwärmte Glasplatten gegossen und mit einem Stöckchen gleichmäßig verteilt, horizontal gehalten, bis es zu erstarren beginnt. Man hat so gleichmäßig gefärbte Farbplatten, die in einer feuchten Kammer aufbewahrt und kurze Zeit erhalten werden können. Wenn nach ca. 1 Tag die Oberfläche etwas angetrocknet war, brachte ich von verschiedenen Verdünnungen eines Serums je einen Tropfen auf die Platte, einen Kochsalztropfen zur Kontrolle, und konnte so sehen, wie weit noch eine Aufhellung durch den Tropfen bewirkt war. Nach ca. 4 Stunden im Brutschrank legte ich die Platte in ein Gefäß kalten Wassers, um die Flüssigkeitstropfen abzuspülen. Ich ging von der Annahme aus, daß das Serum die Placentareiweißschicht mittels der Fermente auflösen und dadurch die Farbe freimachen würde. Durch Unterlegen eines lichtempfindlichen Papiers ließ sich die Wirkung nach dem Vorgang Kantorowicz' anschaulich machen und registrieren. Über die Brauchbarkeit dieser Methode läßt sich ein Urteil noch nicht fällen, da die Zahl der Untersuchungen noch zu gering ist und ich mit Verbesserungen noch beschäftigt bin. Jedenfalls zeigte ein Gravidenserum nach $^1/_2$ stündiger Erwärmung bei 60° einen deutlichen Unterschied gegenüber dem frischen Serum.

Es war sodann die Frage zu untersuchen, ob etwa ein positiver Ausfall einer der erwähnten Abderhaldenschen Methoden auch mit einer Steigerung von anderen unspezifischen proteolytischen oder antiproteolytischen Eigenschaften einherginge, so daß man die Reaktion ganz oder zum Teil auf solche zurückführen könne. Zu diesen Untersuchungen benutzte ich

einerseits die von Neubauer und Fischer angegebene Glycyltryptophanmethode, andererseits die gebräuchlichen Antitrypsinbestimmungsverfahren.

Neubauer und Fischer fanden im Magensaft von Krebskranken ein Ferment, das fähig war, das Dipeptid Glycyltryptophan in seine Komponenten zu zerlegen und das entstandene Tryptophan nachzuweisen. Lenk und Pollak untersuchten Blutserum auf dasselbe Ferment. Halpern u. a. prüften diese Verfahren nach und fanden dieses Ferment bei den verschiedensten Erkrankungen ohne Regelmäßigkeit, so daß sie dieser Methode jeglichen Wert absprechen. Die Versuchsanordnung ist derart, daß verschiedene Verdünnungen des Serums mit je 0,5 ccm einer 0,4%igen Glycyltryptophanlösung, die uns freundlichst von Kalle & Co., Biebrich, zur Verfügung gestellt wurde, und einigen Tropfen Toluol auf 4 Stunden in den Brutschrank von 37° kommen, dann mit 2 bis 3 Tropfen einer 5%igen Essigsäure angesäuert und tropfenweise mit einer halbgesättigten Chlorkalklösung versetzt werden, bis die Färbung nicht mehr zunimmt. Bei Anwesenheit von freiem Tryptophan tritt eine Rosafärbung auf. Das freie Tryptophan ist durch fermentative Zerlegung des Dipeptids entstanden.

Mandelbaum hatte bei seinen Untersuchungen gefunden, daß dieses Ferment bei einer Brutschranktemperatur von 56° in einer Stunde besser wirke. Ich konnte dies nicht beobachten, sah vielmehr, wie auch Saxl bemerkt, daß eine Erwärmung bei 56° die fermentative Kraft nicht immer zerstört, sie oft schädigt und mitunter auch nicht beeinflußt. Ebenso konnte ich auch in normalen oder sonstigen Seren bei längerem Verweilen im Brutschrank als Ausdruck einer Fermentwirkung eine deutliche Reaktion auf Tryptophan konstatieren. Auch Saxls Untersuchungen hatten als Ergebnis der Formoltitrierung, daß verdauende Fermente in normalem Blute reichlich vorkommen. Ferner wurde der fermentative Charakter dadurch wahrscheinlich gemacht, daß halbstündiges Erwärmen auf 60° die Reaktion verhindert.

Ich untersuchte 47 Seren mit dieser Methode, darunter neben normalen solche von verschiedenartigsten Krankheiten. Manche normalen Sera ergaben das Fehlen, andere das Vorhandensein des Fermentes. Carcinomsera waren zum Teil negativ, zum Teil stark positiv; dieselben Schwankungen bei anderen Krankheiten. Jedenfalls war es nicht möglich, irgendeine Regelmäßigkeit im Ausfall dieser Methode im Blutserum festzustellen so daß ich mich Halpern anschließen muß, der ihr jeglichen diagnostischen Wert abspricht.

Von besonderem Interesse war es indes, zu untersuchen, ob der Ausfall des Dialysierverfahrens dem der Glycyltryptophanprüfung parallel geht.

Bei 38 Seren konnte ich die Resultate der Dialysiermethode erhalten: **es zeigte sich keine Parallelität im Ausfall beider Methoden.**

Tabelle III.
(Vergleich der Tryptophanmethode mit dem Dialysierverfahren.)

Nr.	Diagnose	Abderh.	Nr.	Diagnose	Abderh.
1628	Menorrhag. Erbr. .	Plac. +	1640	Carc. ventr.	Carc. +
1766	Carc. mammae recid.	Carc. ±	1714	Wöchnerin 7. Tg. .	Plac. +
1773	Carc. ventric. . . .	Carc. ±	1748	Carc. linguae . . .	Carc. +
1758	Submaxill. tumor .	Carc. +	163	Gravidität	Plac. —
1759	Carc. mammae . .	Carc. ±	199	Carc. mammae inop.	Carc. ?
1840	Carc. oesephagi . .	Carc. ±	280	Carc. linguae . . .	Carc. ±
212	Lebercarcinom . . .	Carc. —	230	normal	—
244	Carc. mammae inop.	Carc. +	262	Carc. ventric. . . .	Carc. —
351	Carc. vulvae	Carc. ±	366	Dementia praec. . .	Carc. —
383	Carc. vaginae . . .	Carc. —	384	Epitheliom	Carc. —
	stark positiv			negativ	

In der vorstehenden Tabelle sind einerseits die Seren aufgeführt, die nach meinen Protokollen stark positiv, andererseits die, welche negativ reagierten. Die schwach positiven oder zweifelhaften habe ich in dieser Tabelle fortgelassen; es erhellt aus dieser Zusammenstellung, daß zwar mehrere mit dem Dialysierverfahren negativ reagierende Sera auch keine peptolytische Wirkung zeigten, daß aber eine genaue Übereinstimmung im Ausfall der Reaktion nicht vorhanden war. **Es dürfte also nicht angängig sein, den Ausfall der Ninhydrinreaktion mit dem Fehlen oder Vermehrtsein dieser allgemeinen unspezifischen Fermente in Zusammenhang zu bringen.**

Weil wir mit der Dialysiermethode nach proteolytischen Fermenten tryptischen Charakters fahnden, so war es besonders interessant zu untersuchen, ob das antitryptische Vermögen dieser Sera ein gleiches Verhalten zeigte. Mit den verschiedenen uns zur Verfügung stehenden Methoden zum Nachweis des Antitrypsins im Serum ist durch Untersuchungen anderer Autoren festgestellt, daß dieses Ferment bei vielen Erkrankungen vermehrt ist, so bei Carcinom, Morbus Basedowii, Nephritis, Fieberkrankheiten, Frauenkrankheiten und auch in den drei ersten Wochen des Puerperiums (Rosenthal). Namentlich bei Carcinom hat man dem antitryptischen Titer besondere Beachtung geschenkt, da dieser in sehr vielen Fällen gesteigert ist.

Zitronblatt, der bei 90% seiner Fälle eine Steigerung fand, beobachtete keinen Zusammenhang mit der Größe des Herdes. Pinkuss erhielt in 90 bis 94% positiven Ausschlag, wenn andere Erkrankungen, besonders Eiterungen, ausgeschaltet werden können. Wenn auch bei Carcinom manchmal ein normaler Titer gefunden wird, so spricht doch bei Carcinomverdacht das Fehlen einer Steigerung gegen die Annahme eines bösartigen Tumors (Boekelmann und Simons, Waelli, Katzenbogen). Bei Differentialdiagnose zwischen Carcinom und Sarkom spricht ein nicht erhöhter Titer gegen Carcinom, da er bei Sarkom gewöhnlich in normalen Grenzen gefunden wird (Krym). Ziemlich übereinstimmend fanden diese Untersucher auch, daß die Antitrypsinbestimmung prognostisch von Bedeutung ist, indem der Titer nach der Operation langsam abfällt und auf der Norm bleibt, während erneutes Ansteigen die Annahme von Metastasen wahrscheinlich macht, wie Brieger ausführlich bei einem Magencarcinomfall schildert, der über längere Zeit regelmäßig auf Antitrypsin untersucht wurde. Man fand so nach der Operation erst Abfall, dann nach langer Zeit staffelförmiges Ansteigen bis zu hohen Werten. Durch die Sektion wurden reichliche Metastasen nachgewiesen.

Bei Ausschluß von Tumoren und anderen Erkrankungen ist die Antitrypsinbestimmung auch für die Schwangerschaftsdiagnose verwertbar. Besonders Rosenthal erwärmt sich sehr für diese Methode und schreibt ihr fast absolute Sicherheit zu, wenn man mehrere Untersuchungen macht. Ein Höherwerden des Titers weist sicher auf Schwangerschaft hin. Zu denselben Resultaten kamen Franz und Jarisch, v. Graff und Zubrzycky, Gammeltoft, der allerdings der Fuldschen Caseinmethode für vergleichende Untersuchungen keinen Wert beimißt, sich vielmehr der Formoltitrierung nach Sörensen bedient. Eine Erhöhung des antitryptischen Vermögens konnte dieser Autor bei graviden Kaninchen und Kühen nicht nachweisen. Auch für die Diagnose bösartiger Geschwülste bietet der antitryptische Titer bei Tieren keinen Anhaltspunkt, wenn er auch manchmal erhöht ist (Mello). Bei Pankreaserkrankungen untersuchte Groß das antitryptische Vermögen und fand, daß die Methoden klinisch brauchbare Resultate liefern, ebenso Meyer, der beim Diabetes die Beziehungen zwischen Antitrypsin und Blutzuckergehalt prüfte. Dieser Forscher stellte beim Adrenalindiabetes des Kaninchens keine Erhöhung des antitryptischen Vermögens, ja eine Verminderung fest, trotz gesteigerten Blutzuckergehaltes, und erklärt dies durch Verminderung der Pankreassubstanz und dadurch des Trypsins.

Während Rosenthal die hemmende Wirkung bei der Caseinverdauung nur auf die Anwesenheit der Eiweißabbauprodukte schiebt und das Antitrypsin für hitzebeständig und nicht spezifisch hält, sind sich die meisten Forscher darin einig, daß es ein echtes Antiferment darstellt, thermolabil, nicht diffusibel und streng auf tryptische Fermente eingestellt sei (Meyer, Kämmerer, Fresemann u. a.). Ich selbst kann bestätigen, daß halbstündiges Erhitzen auf 60° die antifermentative Kraft aufhebt. Das Alter spielt nach meinen Beobachtungen ebenfalls eine Rolle, indem Serum, das über eine Woche im Eisschrank auf-

bewahrt wurde, öfters gar keine antitryptische Kraft mehr besaß. Diese Abnahme ist indes nicht immer wahrzunehmen; der Titer kann auch nach dieser Zeit dieselbe Höhe zeigen.

Ich wandte zu meinen Untersuchungen zuerst die Caseinmethode nach v. Bergmann und Meyer an, später nur die Plattenmethode nach Markus, die infolge ihrer Einfachheit gute, eindeutige Resultate liefert. Da mir das Mischen des Serums mit der Trypsinlösung (Trypsin Merck) mittels der Platinöse zu ungenau erschien, brachte ich in kleine Reagensgläser aus einer Tropfpipette erst die Trypsinlösung von 1 bis 10 Tropfen hinein, dann nach Reinigung mit derselben Pipette je einen Tropfen Serum in jedes Glas. Auf diese Weise läßt sich ein ganz gleiches Verhältnis leicht erzielen. Aus jeder Mischung entnahm ich dann mit einer Platinöse 3 bis 4 Proben und brachte sie auf die Löfflerplatte dicht nebeneinander. Auf diese Weise braucht man für jedes Serum nur eine Platte statt für jede Verdünnung eine andere. Nach mehrstündigem Aufenthalt ist auf der Platte die Verdünnung abzulesen, die noch gerade eine Vertiefung auf der Oberfläche gemacht hat. Diese bestimmt den Titer. Für normale Seren fand ich so den Titer schwankend zwischen 3 : 1 und 6 : 1. Ob diese Schwankungen individuell verschieden sind oder sich nach dem angewandten Rinderserum richten, habe ich nicht weiter untersucht. Nach den Untersuchungen Giraults und Rubinsteins ist es nicht anzunehmen, daß der Titer bei derselben Person erheblich schwankt, denn diese fanden ihn unbeeinflußt von Hunger und Verdauung; ebenso beobachteten Remedi und Bolognesi keinen Unterschied im Antitrypsingehalt des arteriellen und venösen Blutes, auch nicht zwischen dem Blute aus einer Magenader und dem peripherischen. Nur nach Mahlzeiten war mehr Antitrypsin in der Darmader als peripher.

Bei meinen 38 untersuchten Fällen zeigte es sich ebenfalls, daß bei den meisten Erkrankungen der antitryptische Titer erhöht war, sowohl bei bösartigen Geschwülsten als auch bei Lungentuberkulose und bei Gravidität. Jedoch kann auch bei allen diesen Krankheiten der Titer normal sein, z. B. 8 mal unter 22 Carcinomfällen.

Besondere Bedeutung gewinnen diese Resultate aber erst bei Vergleich mit dem Ausfall des Abderhaldenschen Dialysier-

verfahrens, den ich in der folgenden Tabelle für die Carcinomfälle zusammenstelle.

Tabelle IV.

(Vergleich des antitryptischen Titers mit dem Ausfall der Dialysiermethode.)

	Nr.	Diagnose	Abderh. Dial.	Anti-trypsin	Nr.	Diagnose	Abderh. Dial.	Anti-trypsin	Nr.	Diagnose	Abderh. Dial.	Anti-trypsin	
Casein-methode	1640	Magencarc.	+	120	1642	Carc. faciei	±	90	1606	Lymphosark.	—	110	Casein-methode
	1645	Carc. uteri	++	130	1652	Carc. ventric.	?	140	1806	Epitheliom	—	110	
	1757	Carc. mammae	+	110	1655	Carc. uteri	±	130	1805	Carc. ventric.	—	6:1	Platten-methode
	1758	Maxill. tum.	+	120	1840	Carc. oesoph.	±	2:1	205	Carc. recti	—	7:1	
Platten-methode	1738	Carc. mammae	+	3:1	199	Carc. mammae	?	9:1	384	Epitheliom	—	8:1	
	1884	Carc. oesoph.	+	8:1	280	Carc. linguae	±	8:1	383	Carc. vaginae	—	6:1	
	244	Carc. mammae	+	9:1	351	Carc. vulvae	±	12:1	372	Carc. mandib.	—	7:1	
									385	Carc. mammae	—	10:1	

In die Tabelle habe ich nur die Carcinome aufgenommen, weil diese am zahlreichsten und einheitlichsten sind. In der ersten Rubrik stehen die mit der Dialysiermethode positiv reagierenden, in der Mitte die zweifelhaften und in der dritten die negativen. Neben der Bezeichnung für die Abderhalden-Methode stehen die erhaltenen Werte der Antitrypsinbestimmung, und zwar ist der mit der Caseinmethode erhaltene Wert 110 und darunter im Bereich des Normalen, mit der Plattenmethode 6:1 noch normal vorkommend. Auch hier sieht man, daß zwischen dem Ausfall beider Methoden keine Ähnlichkeit besteht, daß in allen Rubriken hohe und niedere Titer vorkommen. Unter diesen 22 Seren von Kranken mit bösartigen Geschwülsten ist nur ein Drittel mit der Dialysiermethode positiv, während doch zwei Drittel einen erhöhten antitryptischen Titer zeigen, und von den anderen 8 auch 5 an der oberen Grenze des Normalen stehen.

Zum Schluß gebe ich eine Zusammenstellung der Sera, die mit den drei oder vier Methoden untersucht wurden: der optischen und Dialysiermethode, der Glycyltryptophanprobe und dem Antitrypsinversuch. Drei unter diesen 19 Seren zeigen gleichen positiven Ausschlag der angewandten Methoden, zwei gleichen negativen. Unter den sieben mit allen vier Methoden untersuchten Fällen sind außerdem zwei mit entsprechenden drei Verfahren, wobei beidemal die Antitrypsinbestimmung entgegengesetzten Ausfall hatte. Die Verschiedenheiten der anderen gehen zur Genüge aus der Tabelle selbst hervor.

Tabelle V.

Nr.	Diagnose	Abderhalden opt.	Dialyse	Glyc.	Antitrypsin
1640	Magencarcinom . . .		+	—	erhöht
1805	„ . . .		—	+	normal
1806	Epitheliome		—	+	„
1840	Carc. oesophagi . . .		±	++	„
199	Carc. mammae inop. .		?	—	erhöht
244	„ „ „ .		+	++	„
366	Dementia praec. . . .		—	—	normal
368	Lupus vor 20 Jahren .		—	+	„
372	Carc. mandibul. . . .		—	±	erhöht
383	Carc. vaginae		—	++	normal
384	Epitheliome		—	—	erhöht
385	Carc. mammae		—	+	„
163	Gravidität	—	—	—	„
205	Carc. recti recid. . . .	+	—	±	„
230	Normal	—	—	—	normal
280	Carc. linguae	—	±	—	erhöht
309	Affectio apic.	+	+	+	„
351	Carc. vulvae	+	+	++	„
387	Abortus 2 Mon. . . .	+	+	+	normal

Auch aus dieser Gegenüberstellung ersieht man, daß allerdings gelegentlich ein gleichlautender Ausschlag aller angewandten Methoden zu bemerken ist, d. h. daß mitunter in den Seren ein erhöhter proteolytischer Fermentgehalt und Antifermentgehalt neben den Abderhaldenschen Fermenten nachweisbar ist, daß aber von einer Parallelität in ihrem Auftreten nicht gesprochen werden kann.

Zusammenfassung.

1. Die optische Methode lieferte mir nur in 21 von 27 Fällen Resultate, die mit dem klinischen Befund harmonierten, mehrfach waren jedoch unspezifische Drehungen vorhanden.

2. Die beiden Abderhaldenschen Methoden stimmten in 20 von 28 Untersuchungen überein und entsprachen in 19 von diesen der klinischen Diagnose.

3. Der Gehalt des Serums an peptolytischem Ferment, geprüft an Glycyltryptophan, geht nicht parallel mit dem Ausfall der Dialysiermethode, wenn auch manchmal beide Proben positiv oder negativ waren.

4. Auch ein hoher antitryptischer Titer zeigte keine sichere Parallelität mit dem Ausfall der Abderhalden-Reaktion, wenn

beide auch öfters gleiches Resultat ergaben. **Speziell war bei Carcinom weit häufiger ein erhöhter antitryptischer Titer nachzuweisen (unter 22 Fällen 14 mal) als eine positive Abderhalden-Reaktion (7 mal).**

5. In wenigen Fällen entsprachen sich alle vier Methoden und harmonierten mit dem klinischen Befund.

Literatur.

Abderhalden, Abwehrfermente. Springer, Berlin 1913 und 1914, 3. und 4. Aufl.

v. Bergmann und Meyer, Berl. klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 37.

Boeckelmann und Simons, Bijdrage tot de kennis van het antitrypsingehalte van het menschlijk bloedserum. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk 1910, 2. Hälfte, Nr. 19.

Brieger, Demonstration zur Prognose des Carcinoms. Berl. klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 7.

Brieger und Schwalm, Über den Nachweis von Fermenten und Antifermenten auf die Farbplatten. Med. Klinik, Wien 1914.

Corsini, Beitrag zur Kenntnis des antitryptischen Fermentes im Blutserum. Atti R. Accad. Fisiocritici, anno 218, p. 777.

Deetjen und E. Fränkel, Untersuchungen über die Nynhydrinreaktion des Glucosamins und über die Fehlerquellen bei der Ausführung Abderhaldens Dialysierverfahrens. Münchner med. Wochenschr. **1914**, Nr. 9.

Fermi, Reagenzien und Versuchsmethoden zum Studium der proteolytischen und gelatinolytischen Enzyme. Arch. f. Hygiene **55**.

Flatow, Zur Frage der sog. Abwehrfermente. Münchner med. Wochenschr. **1914**, Nr. 21.

E. Fränkel, Über die Verwendung der Abderhaldenschen Reaktion bei Carcinom und Tuberkulose. Berl. klin. Wochenschr. **1914**, Nr. 8.

E. Fränkel und Gumpertz, Anwendung des Dialysierverfahrens (nach Abderhalden) bei der Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. **1913**, Nr. 33.

Franz und Jarisch, Beiträge zur Kenntnis der serologischen Schwangerschaftsdiagnostik. Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 39.

V. Fresemann, Über die proteolytische und antitryptische Wirkung des menschlichen Serums. Inaug.-Dissert. Groningen 1911.

Derselbe, Über die proteolytische und antitryptische, resp. antitryptische Wirkung des menschlichen Blutserums. Folia microbiologica, Holländ. Beiträge **1912**, 260.

Freund und Brahm, Die Schwangerschaftsdiagnose mittels der optischen Methode und des Dialysierverfahrens. Münch. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 13.

Gameltoft, Untersuchungen über die antiproteolytischen Substanzen während der Gravidität. Ugeskrift for Laeger **1913**, Nr. 30.

Girault und Rubinstein, Pouvoir antipeptique du serum humain dans les affections du tube digestif. Compt. rend. Soc. Biol. **72**, Nr. 26, 1912.

v. Graff und Zubrzycky, Über den Antitrypsingehalt des Blutes bei Schwangerschaft und Carcinom. Zeitschr. f. Geburtshilfe u. Gynäkol. **72**, 1912.

Groß, Versuche an Pankreaskranken. Deutsches Arch. f. klin. Med. **108**, Heft 1/2, 1912.

Isaja, Die antitryptische Reaktion bei bösartigen Tumoren und ihr Mechanismus. Tumori **1**, 87, 1911.

Kämmerer, Studien über die Antitrypsine. Deutsches Arch. f. klin. Med. **103**, Heft 3/4, 1911.

Kantorowicz, Eine neue Methode der Darstellung und Registrierung der Wirkung proteolytischer Fermente. Münch. med. Wochenschr. **1912**, Nr. 46.

Katzenbogen, Über die prognostische und diagnostische Bedeutung der Antitrypsinbestimmung im Blutserum. Berl. klin. Wochenschr. **1911**, Nr. 41.

Kjaergaard, Über Abderhaldens Graviditätsbestimmung, ihre Methodik und Spezifität. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig.-Bd. **20**, Heft 1.

Krym, Über diagnostische Bedeutungen der Eigenschaften des Bluteerums. Prakticzesky Wratsch **190**, 51, Nr. 50.

C. Lange, Erfahrungen mit dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren. Diese Zeitschr. **61**, Heft 3/4.

Lenk und Pollak, Über das Vorkommen von peptolytischen Fermenten in Exsudaten und dessen diagnostische Bedeutung. Deutsches Arch. f. klin. Med. **109**, Heft 3/4.

Mandelbaum, Über peptolytische Fermente in Zellen und im Blute. Münch. med. Wochenschr. **1914**, Heft 9.

Markus, Berl. klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 14; **1909**, Nr. 4.

Mello, Ricerche sopra la siero di cavalli affetti da tumori. Arch. Scient. R. Soc. Nat. **8**, 21, 1910.

Meyer, Kritisches und Experimentelles zur Lehre vom Antitrypsin. Fol. Serol. **7**, 471, Heft 5, 1911.

Derselbe, Zur Antitrypsinverminderung beim Diabetes. Diese Zeitschr. **40**, 125.

Mießner und Immisch, Die optische Methode und ihre Anwendung in der Schwangerschaft. Mitt. d. Kaiser Wilh.-Instit. f. Landwirtschaft in Bromberg **1912**.

Petri, Über Fermentreaktion im Serum Schwangerer, Kreißender und Wöchnerinnen. Vortrag. Deutsche med. Wochenschr. **1913**, Nr. 27.

Derselbe, Über das Auftreten von Fermenten im Tier- und Menschenkörper nach parenteraler Zufuhr von art- und individuumeigenem Serum. Münch. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 21.

Pinkuss, Die Bedeutung der Antitrypsinbestimmung für die Diagnose des Carcinoms. Berl. klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 21.

Derselbe, Weitere Erfahrungen über serologische Verlaufe und Behandlung des Carcinoms. Deutsche med. Wochenschr. **1912**, Nr. 2/3.

Rosenthal, Untersuchungen über die antiproteolytische Wirkung des Blutserums. Folia serolog. **6**, 285, Heft 3, 1911.

Derselbe, Sierodiagnosi della gravidanze. Biochimica e Terap. Sper. **3**, 160, 1911.

Derselbe, Über die Serumdingnose der Schwangerschaft. Vortrag. Deutsche med. Wochenschr. **1913**, Nr. 25.

Derselbe, Über weitere Erfahrungen mit der serologischen Schwangerschaftsdiagnostik. Berl. klin. Wochenschr. **1913**, Nr. 25.

Remedi und Bolognesi, Les antiferments proteolytiques du serum du sang. Arch. ital. de Biol. **56**, 187, 1912.

Rübsamen, Zur biologischen Diagnose der Schwangerschaft mittels der optischen Methode und des Dialysierverfahrens. Münch. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 13.

Saxl, Zur Kenntnis der proteolytischen Enzyme im Serum Gesunder und Kranker. Med. Klin. Wien **1914**.

Thar und Kotschneff, Beiträge zur Kenntnis der Abderhalden-Reaktion. Diese Zeitschr. **63**, Heft 4, 5, 6.

Waelli, Zur Frage der klinischen Bedeutung des Antitrypsins im Blutserums. Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **25**, Heft 1, 1912.

Weinberg und Rubinstein, Recherches sur le pouvoir antitryptique du serum. Compt. rend. Soc. Biol. **72**, Nr. 1, 1912.

Welecki, Der diagnostische und prognostische Wert der Antitrypsinreaktion des Blutserums beim Gebärmutterkrebs. Przeglad Lekarski **1912**, Nr. 14.

Zitronblatt, Die diagnostische Bedeutung des Antitrypsins des Blutserums bei Carcinom und anderen Erkrankungen. Wratschebnaja Gazeta **1911**, Nr. 17, 19.

Zlatogorow und Scheremez, Über die Bildung des Antitrypsins und über die praktische Bedeutung der antitryptischen Reaktion. Wratschebnaja Gazeta **1912**, Nr. 1 bis 4.

Die Ninhydrinreaktion der Peptone.

Nachtrag zu der Arbeit von G. Hälsen „Untersuchungen über Ferment- und Antifermentwirkung des Serums".

Von

Ernst Fränkel.

(Eingegangen am 24. Juli 1914.)

Es schien uns von Interesse, die Grenzkonzentration festzustellen, in der die verschiedenen Peptone die Ninhydrinreaktion geben. Die folgende Tabelle gibt die positiven resp. negativen Grenzwerte an.

	Positiv	Negativ
Seidenpepton	1:8000	1:9000
Witte-Pepton	1:500 (1:600 ±)	1:700
Placentarpepton (Höchst) . . .	1:2500	1:8000
Carcinompepton	1:250	1:300
Tuberkulose-Lungen-Pepton I . .	1:280	1:340
„ II . .	1:300	1:400

Wir ersehen daraus, wie sehr die Reaktionsfähigkeit der einzelnen Peptone voneinander abweicht. Man wird also in Fällen, wo ein Abbau des Substrates nur bis zu den Peptonen erfolgt ist, außerordentlich wechselnde Resultate je nach dem Substrat erhalten müssen, und zwar viel mehr positive mit Placenta als mit Lungen- oder Carcinomsubstrat, und mehr positive mit Substrat von tuberkulöser Lunge als mit solchem von Carcinom, selbst wenn gleichstarke fermentative Kräfte auf gleiche Substratmengen einwirken. Auch schwächere Fermentwirkungen werden also beim Abbau von Placentarsubstrat zu Pepton leichter in Erscheinung treten und den Schwellenwert der Reaktion überschreiten können als bei den anderen Substraten. Für die Fälle, wo eine weitergehende Spaltung eintritt, besagt natürlich der Befund weniger. Die Peptone wurden nach der Vorschrift von Abderhalden (s. voranstehende Mitteilung von Hälsen) hergestellt. Gekocht wurden die Proben bei der Bestimmung mit 1 ccm 0,2 $^0/_0$ Ninhydrin 1 Minute über der Flamme in Jenenser Reagensröhrchen bei 10 ccm Volumen.

Über den Einfluß der Säuren auf die dialysierte Maltase.

Von

W. Kopaczewski.

(Aus dem Institut Pasteur, Paris.)

(Eingegangen am 16. Juli 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Im Laufe unserer Untersuchungen über die Dialysierbarkeit der Maltase haben wir festgestellt[1]), daß durch die Dialyse ungefähr 95 % der festen Stoffe eliminiert wurden. So große Mengen Verunreinigungen dürften auf die Resultate der Säurewirkung irgendwelchen Einfluß haben. Um also scharf diejenige Konzentration der Säuren zu bestimmen, die am günstigsten für die Hydrolyse ist, müßte man diese Verunreinigungen entfernen. Man kann dies auf zweierlei Wegen erreichen. — Bertrand und seine Schüler[2]) lösen diese Aufgabe durch die Reinheit der angewandten Fermentpräparate (wiederholte Präcipitation usw.), indessen arbeiten sie mit sehr kleinen Mengen. Man kann aber die Verunreinigungen sehr bequem durch die Dialyse entfernen. Nach der Dialyse bleibt immer noch ein unbedeutender Mineralrückstand, der sich nicht entfernen läßt, wenn wir auch die Fermentlösung durch die elektrische Dialyse reinigen. Es ist aber eine bekannte Tatsache, daß man die Kolloide bisher nie ganz von den Mineralbestandteilen befreien könnte. Die Menge der zurückgebliebenen anorganischen Stoffe ist jedoch sehr winzig. Sie kann die Ergebnisse der Säuren auf die Maltasewirkung kaum beeinflussen. Es würde indessen sehr interessant sein zu sehen, ob die Unterschiede, die ich zwischen dem Einfluß der Säuren auf die Hydrolyse der

[1]) W. Kopaczewski, diese Zeitschr. **56**, 95, 1913.

[2]) Bertrand u. Mitarbeiter, Annales de l'Inst. Pasteur **26**, 321 und 932, 1912.

Maltose und ihre physikalischen Eigenschaften (Inversionskraft, Dissoziationsgrad) habe feststellen können, auch dann noch bestehen, wenn man statt gewöhnlicher die dialysierte Maltase anwendet; mit anderen Worten: ob ein Parallelismus zwischen dem Dissoziationsgrad und katalytischer Säurewirkung vorhanden ist, oder ein anderer Faktor aufgesucht werden muß, der die bisherigen Ergebnisse erklärt.

Die Technik unserer Versuche war die folgende:

Als Maltase und Maltose dienten dieselben Präparate, die uns für die vorige Arbeit dienten[1]). Die Dialyse war auch in ähnlicher Weise ausgeführt, nur statt eines gewöhnlichen bedienten wir uns eines analytischen Dialysators[2]). Die Dialyse dauerte 72 Stunden. Die dialysierte Maltase reagierte neutral gegen Heliantin; sie zeigte einen Aschengehalt von 1,0 ‰ und eine Leitfähigkeit $K = 9{,}5 \cdot 10^{-6}$.

Eine Anzahl von Reagensgläser aus Jenaer Glas, durch Wasserdampf gereinigt, wurde mit 2 ccm reinen Wassers ($K = 1{,}5$ bis $2{,}0 \cdot 10^{-6}$) resp. einer Säurelösung in verschiedenen Konzentrationen gefüllt; die ersten dienten als Kontrolle. Die Gläser und die Lösungen der Maltase und Maltose wurden dann in einen Thermostaten von der Temperatur 37° (± 0,5°) C gebracht und darin ½ Stunde gelassen. Dann mischte man die Lösung der Maltase mit der Maltose und pipettierte sofort in jedes Reagensglas 3 ccm der Mischung. In einem der Reagensgläser wurde die Hydrolyse sofort durch 1 Tropfen Natronlauge aufgehoben, um die reduzierbare Zuckermenge analytisch zu bestimmen. Es wurde kein Antisepticum benutzt[3]) und die eigene hydrolytische Wirkung der Säuren nicht geprüft[4]). Nach 3½ Stunden wurde die Hydrolyse in allen Gläsern durch 33 %ige Natronlauge bei Gegenwart von Phenolphthalein gehemmt und die gebildete Zuckermenge mit der Bertrandschen Methode bestimmt. Die Säuren wurden titriert unter Benutzung von Phenolphthalein als Indicator. Jede Säure wurde in 2 bis 3 Serien untersucht, um diejenige Konzentration, die am meisten die Hydrolyse durch Maltase fördert, zu bestimmen.

[1]) W. Kopaczewski, l. c.
[2]) W. Kopaczewski, diese Zeitschr. **54**, 27, 1913.
[3]) W. Kopaczewski, diese Zeitschr. **44**, 349, 1912.
[4]) W. Kopaczewski, Bull. Soc. Chim., 4. Serie, **11**, 850, 1912.

Die angewandten Säuren sind im Handel als „chemisch rein“ bezeichnet.

Um die entsprechenden Konzentrationen für die Maltase und Maltose aufzufinden, haben wir einige Versuche angestellt und folgende interessante Beobachtungen gemacht (Tab. I):

Tabelle I.

Nr.	Die Endkonzentrationen der Maltase %	Der hydrolysierte Teil.			
		Maltose 0,5% (Endkonz.) nach		Maltose 1% (Endkonz.) nach	
		3 1/2 Std. %	7 Std. %	3 1/2 Std. %	7 Std. %
1	0,10	**34,1**	**51,1**	10,7	21,6
2	0,25	29,3	48,9	19,0	51,1
3	0,50	26,5	42,2	20,1	**54,1**
4	1,00	24,4	42,8	24,8	41,8
5	2,00	20,3	23,7	**34,1**	45,3

Wir haben also die Maltose in 1% iger Lösung und Maltase in 2% iger[1]) Lösung einwirken lassen während 3 1/2 Stunden.

Tabelle II.

Nr.	Konzentrationen der Säuren	Gewöhnliche Maltase			Dialysierte Maltase		
		I. Serie	II. Serie	III. Serie	I. Serie	II. Serie	III. Serie
1	n/10	− 100,0			− 100,0		
2	n/20	− 87,2			− 100,0		
3	n/40	− 66,4	− 68,0		− 100,0		
4	n/60		− 22,4				
5	n/80		+ 17,2				
6	n/100	+ 58,4	+ 58,2		− 100,0		
7	n/150		+ 140,2	+ 138,8			
8	n/160			+ 144,1			
9	n/170			**+ 146,0**			
10	n/180			+ 140,0			
11	n/190			+ 128,2			
12	n/250	+ 68,1			− 100,0	− 100,0	
13	n/500	+ 51,7			− 100,0	− 100,0	
14	n/600					+ 92,8	
15	n/700					+ 143,5	+ 147,3
16	n/725						**+ 147,5**
17	n/750	+ 36,4			+ 144,0	+ 143,7	+ 143,7
18	n/775						+ 131,2
19	n/800					+ 110,0	+ 108,6
20	n/900					+ 50,0	
21	n/1000	+ 18,4			+ 15,4		
22	n/2250	0			0		

[1]) Wegen der Verdünnung, die die Fermentlösung während der Dialyse erfährt, wurde mit viel stärkeren Konzentrationen, die dann verdünnt wurden, gearbeitet.

Die Tabelle II veranschaulicht uns am besten den Gang der Untersuchungen. Die Zahlen bezeichnen die Steigerung (+) bzw. Verminderung (—) der hydrolytischen Kraft der Maltase bei Gegenwart der Säuren; unter Null sind diejenigen Säurekonzentrationen gemeint, die keinen Einfluß auf die Hydrolyse ausüben.

Wenn wir die erhaltenen Resultate durch eine Kurve darstellen, so bekommen wir z. B. für die Schwefelsäure, daß diese Kurve viel regelmäßiger verläuft, als mit der undialysierten Maltase.

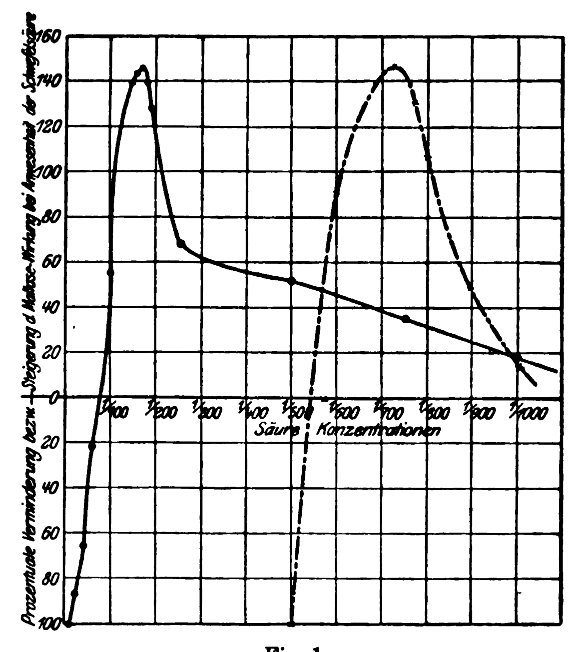


Fig. 1.

Es folgen die Ergebnisse mit anderen Säuren. Diese Säuren waren unter 62 vorher studierten ausgewählt, da sie am besten die Unterschiede zwischen Dissoziationsreihe und katalytischer Wirkung wiedergeben[1]) (Tabelle III).

---

[1]) Kopaczewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 182, 1912.

Tabelle III.

Nr.	Säuren	Optimale Konzentration der Säuren für undialysierte Maltase	dialysierte Maltase
1	Salzsäure	$^n/_{160}$	$^n/_{600}$
2	Schwefelsäure	$^n/_{170}$	$^n/_{725}$
3	Phosphorsäure	$^n/_{25}$	$^n/_{125}$
4	Ameisensäure	$^n/_{60}$	$^n/_{120}$
5	Essigsäure	$^n/_{35}$	$^n/_{50}$
6	Monochloressigsäure	$^n/_{150}$	$^n/_{200}$
7	Dichloressigsäure	$^n/_{200}$	$^n/_{500}$
8	Trichloressigsäure	$^n/_{250}$	$^n/_{625}$
9	Propionsäure	$^n/_{20}$	$^n/_{25}$
10	Buttersäure (normale)	$^n/_{10}$	$^n/_{10}$
11	Oxalsäure	$^n/_{150}$	$^n/_{650}$

Wenn wir die beigegebenen Resultate betrachten, so sehen wir, daß die optimalen Säurekonzentrationen bedeutend niedriger für die dialysierte Maltase sind als diejenigen für undialysierte. So zeigt z. B. die undialysierte Maltase das Optimum ihrer Wirkung bei Gegenwart von $^n/_{170}$-Schwefelsäure, dagegen ist für die dialysierte dieses Optimum schon mit der Konzentration $^n/_{725}$ erreicht.

Nehmen wir Salzsäure als Basis der Berechnungen, ordnen wir die Säuren in eine Reihe und vergleichen die erhaltene Reihe mit der Affinität und Inversionsreihe, so sehen wir, daß fast sämtliche Unterschiede bestehen bleiben (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Nr.	Säuren	Molekulargewicht	Wirksamkeit der Säuren (HCl = 100); in bezug auf d. Maltase undialysierte	dialysierte	Inversionswirkung (HCl = 100)	Affinitätsreihe (HCl = 100)
1	Salzsäure	36,5	100,0	100,0	100,0	100,0
2	Schwefelsäure	98,0	106,2	120,8	53,6	65,1
3	Phosphorsäure	98,0	15,6	20,8	6,23	7,3
4	Ameisensäure	46,0	37,5	20,0	1,53	—
5	Essigsäure	60,0	21,8	5,8	0,40	1,4
6	Monochloressigsäure	94,5	93,7	33,3	4,84	4,9
7	Dichloressigsäure	129,0	125,0	83,3	27,1	25,3
8	Trichloressigsäure	163,5	156,2	104,2	75,4	62,3
9	Propionsäure	74,0	12,5	4,1	—	—
10	Buttersäure (normale)	88,0	6,2	1,7	—	—
11	Oxalsäure	90,0	92,5	108,3	18,6	19,7

Untersuchen wir die Wasserstoffionenkonzentrationen nach der Formel $[H^{\cdot}] = \sqrt{K} \cdot [\text{Säure}]$. Diese Berechnung ist ermöglicht durch die praktisch vollkommene Abwesenheit von Salzen in der dialysierten Maltase und Maltose. Wir erhalten dann folgende Werte (Tabelle V):

Tabelle V.

Nr.	Säuren	Optimale Konzentration der Säure für die		$[H^{\cdot}]$	
		undialysierte Maltase	dialysierte Maltase	undialysierte Maltase	dialysierte Maltase
1	Ameisensäure	$n/_{60}$	$n/_{125}$	$2{,}5 \times 10^{-4}$	$1{,}2 \times 10^{-4}$
2	Essigsäure	$n/_{35}$	$n/_{50}$	$1{,}2 \times 10^{-4}$	$8{,}4 \times 10^{-5}$
3	Monochloressigsäure .	$n/_{150}$	$n/_{200}$	$2{,}6 \times 10^{-4}$	$1{,}8 \times 10^{-4}$
4	Dichloressigsäure . .	$n/_{200}$	$n/_{500}$	$1{,}1 \times 10^{-3}$	$4{,}5 \times 10^{-4}$
5	Trichloressigsäure . .	$n/_{250}$	$n/_{625}$	$4{,}4 \times 10^{-3}$	$1{,}6 \times 10^{-3}$
6	Propionsäure	$n/_{20}$	$n/_{25}$	$1{,}85 \times 10^{-4}$	$1{,}5 \times 10^{-4}$
7	Buttersäure (normale)	$n/_{10}$	$n/_{10}$	$3{,}8 \times 10^{-4}$	$3{,}8 \times 10^{-4}$
8	Oxalsäure	$n/_{150}$	$n/_{650}$	$2{,}22 \times 10^{-4}$	$5{,}0 \times 10^{-4}$

Also $p_H = \log [H^{\cdot}] = 3{,}1$ bis $5{,}8$ je nach der Natur der angewandten Säure. Wenn wir diese Zahl mit derjenigen von Michaelis und Rona[1]) vergleichen, so sehen wir, daß die von uns für Essigsäure gefundene ziemlich gleichwertig ist, die diese Forscher für die undialysierte Maltase gefunden haben, indem sie mittels Acetat- und Phosphatgemischen die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentrationen gewechselt hatten.

Ich möchte bemerken, daß die direkte Messung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentrationen bei den ungereinigten Fermenten und auch die Berechnung nach der vereinfachten oben gegebenen Formel ohne Rücksicht auf die Temperaturänderungen nicht einwandfrei ist und mit einem Fehler behaftet ist; dadurch ist der Unterschied in beiden Fällen erklärbar. Aber für die in anderen Säuren gefundenen Werte läßt sich kein Parallelismus bemerken. Man muß nach einem anderen Faktor suchen, der in diesen wie in allen hydrolytischen Prozessen durch Fermente eine Rolle spielt. Denn nicht nur in fermentativen, sondern in allen bisher untersuchten biologischen Vorgängen ist die Reihenfolge der Säuren identisch; sie wechselt von Fall zu Fall und ist niemals der Affinitätsreihe Ostwalds gleich.

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. **57**, 458, 1913.

Aber auch in rein chemischen Katalysen durch H˙-Ionen spiegelt sich dasselbe wieder. Schon Ostwald[1]) hat in seiner Abhandlung über die Inversion des Rohrzuckers durch Säuren bemerkt, daß einige Unregelmäßigkeiten vorhanden sind, die er aber durch sekundäre Erscheinungen erklärte. Und nun sehen wir heute, daß diese Unregelmäßigkeiten sehr groß und keinesfalls durch bloße H˙-Ionenwirkung erklärbar sind. Die Arbeiten von Goldschmidt, Acree, Taylor und Bredig und Mitarbeiter zeigen deutlich, daß nicht nur dem in H˙-Ionen gespaltenen Anteil der Säure die katalytische Wirkung zukommt, sondern daß das ganze Molekül katalytisch wirkt; noch mehr, daß das ungespaltene Molekül in einigen Fällen 2 bis 3 mal so starke katalytische Kraft besitzt, als die gespaltenen H-Ionen. Also die Natur der Säure ist von ausschlaggebender Bedeutung und damit die Natur der Anionen[2]).

Andererseits erfährt aber auch die Theorie der Ionenwirkung heute einige Erschütterungen. Es sind neue Kräfte zur Erklärung der verschiedenen Reaktionen heranzuziehen — wobei wir nur den Haftdruck nennen.

Damit ist gesagt, daß man sich vorläufig nicht über die Art dieser Kräfte äußern kann, die Abweichungen von der Dissoziationsreihe hervorrufen.

Es ist nur sicher, daß der Dissoziationsgrad nicht genügt, um die katalytische Wirkung der Säure zu erklären.

Zusammenfassung.

1. Um die Bedingungen der maximalen Wirkung der Maltase scharf zu bestimmen, muß man dialysierte Fermente anwenden.

2. Der Einfluß der Säuren auf die Hydrolyse der Maltose durch die dialysierte Maltase ist nicht ausschließlich durch den Dissoziationsgrad erklärbar; auch andere Faktoren spielen hier eine nicht unbedeutende Rollen.

---

[1]) Ostwald, Zeitschr. f. prakt. Chem. **29**, 385, 1884 und Zeitschr. f. physik. Chem. **3**, 170, 1889.

[2]) Vgl. unsere Abhandlung in der Zeitschr. f. physikal.-chem. Biol. **1914**, Heft 6, 383.

Physiologische Notizen über eine Luftballonfahrt.

Von

L. Mohr und H. Kuhn.

(Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Halle.)

(Eingegangen am 18. Juli 1914.)

Im Anschluß an unsere Untersuchungen über die Funktion des Herzens im Hochgebirge unternahmen wir am 1. Mai 1913 eine Luftballonfahrt, um dabei Herzschlagvolumen und Minutenvolumen nach Plesch festzustellen. Die Teilnehmer waren Herr cand. ing. Dorn und die beiden Verfasser dieser Notizen d. h. die Teilnehmer der Hochgebirgsexpedition im Sommer 1912 [1]), Führer war Herr Dr. Wigand, Assistent am physikalischen Institut der Universität Halle. Der Aufstieg fand in Bitterfeld mit dem Ballon „Nordhausen“ des sächsisch-thüringischen Vereins für Luftfahrt statt, und wir gelangten nach etwa 7stündiger Fahrt in die Gegend von Salzwedel. Die äußeren Bedingungen für die Versuche auf dieser Fahrt waren sehr günstig: ganz klares und warmes Wetter, so daß weder wir noch unsere Apparate durch Kälte zu leiden hatten, selbst in der höchst erreichten Höhe von 4500 m. Das Befinden der Passagiere war ganz normal bis auf geringe Erscheinungen von Atemnot und Muskelschmerzen, die sich bei Mohr in der höchsten Höhe während kurzer Zeit bemerkbar machten. Auch die Landung war soweit günstig, daß die Apparate und Glasröhren zur Entnahme der Probeluft gänzlich unversehrt blieben, trotzdem der Ballonkorb heftig umschlug. Leider fielen die Untersuchungen doch nicht so aus, daß sie direkt zur Bestimmung von Herzschlag- und Minutenvolumen verwendbar

---

[1]) Vgl. H. Kuhn, Über die Funktion des Herzens im Hochgebirge. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **14**.

wären. Es sei daran erinnert, daß die Pleschsche Methode mit den Gasspannungen im arteriellen und venösen Blut arbeitet. Die Gasspannungen im venösen Blut werden durch Atmung gegen ein Stickstoffgemisch in einem Gummisack erhalten, und es sollen sich dabei Alveolar- und Sackluft ausgleichen. Der Prozentgehalt an O_2 und CO_2 der Sackluft schwankt in unseren Versuchen erheblich, und ersterer ist meist so hoch, daß unmöglich ein Ausgleich wirklich stattgefunden haben kann. So verzichten wir darauf, die damit berechneten, demnach auch unwahrscheinlich hohen Zahlen für Herzschlag- und Minutenvolumen anzugeben. Interessieren wird es aber doch, da nur wenig Stoffwechseluntersuchungen im Luftballon vorliegen[1]), die gewonnenen Zahlen für Atemvolumen, Sauerstoffverbrauch usw. anzugeben. Sie betragen:

Nummer	Name	Höhe m	Barometer mm Hg	Puls	Atemzüge	Abgelesenes Atemvolumen	Reduziertes Atemvolumen	CO_2-Produktion	O_2-Verbrauch	Respirat. Quotient	Alveoläre Gasspannung für CO_2	Alveoläre Gasspannung für O_2	Hämoglobin[2]) nach Plesch %	O_2-Gehalt des arteriell. Blutes
1	Mohr	1100—1300	641—643	80	11,5	10,35	7,71	335,8	390,3	0,85	32,9	86,0	} 98	19,0
2	„	4000—4090	457—452	84	12,0	9,27	5,08	294,7	321,5	0,92	34,2	52,7		16,6
3	„	Ebene[3])		69,5	9,5	6,05	5,61	179,8	272,7	0,71	34,1	99,7	100	19,5
4	„	Brandenb. H.[3]) 3270	520	80	10,0	6,51	4,43	215,9	292,7	0,74	29,5	57,5	107	18,8
5	Kuhn	1325—1220	641—650	90	16,0	7,51	5,69	219,2	307,5	0,71	25,4	83,1	} 98	19,2
6	„	4500—3200	430—484	120	16,0	9,46	5,24	264,0	362,0	0,73	30,8	48,8		15,9
7	„	Ebene[3])		63	11,4	5,36	4,98	198,9	257,5	0,77	41,6	94,4	98	19,1
8	„	Brandenburger Haus[3])	520	71	14,0	6,58	4,51	207,6	292,5	0,71	29,4	56,7	113	19,2
9	Dorn	3010—3195	504—484	83	13,0	7,36	4,37	221,2	277,0	0,80	32,7	56,8	98	16,8
10	„	Ebene[3])		58	11,5	5,28	4,92	194,3	247,6	0,79	41,6	94,4	97	18,8
11	„	Brandenburger Haus[3])	520	60	10,0	7,59	5,17	219,8	277,5	0,77	26,9	64,0	109	19,7

Der Sauerstoffverbrauch ist also deutlich etwas erhöht, und zwar noch ein wenig mehr als im Hochgebirge. Das dürfte aber auf die Versuchsbedingungen im Ballonkorb (unbequemere Lage) und die mit einer solchen Fahrt verknüpften größeren psychischen Leistungen zurückzuführen sein. Deutlich ist das be-

[1]) v. Schrötter und Zuntz, Ergebnisse zweier Ballonfahrten. Arch. f. d. ges. Physiol. 92, 479.

[2]) Die Hämoglobinbestimmungen mit dem Pleschschen Kohlenoxyd-Kolbenkeilhämoglobinometer wurden nicht im Luftballon, sondern vor der Fahrt angestellt.

[3]) Die Zahlen für Ebene (Halle a. S.) und Brandenburger Haus (3270 m) sind Mittelwerte unserer früheren Versuche (s. o.)

sonders bei Mohr, bei dem die Zahlen in 1100 bis 1300 m höher sind als in 4000 bis 4090 m. Der erstere Versuch ist nach schnellem Aufstieg unmittelbar nach Anbringung der Apparate usw. angestellt. Interessant ist nun die Frage, welchen Weg die Sauerstoffversorgung des Organismus nimmt. Der Sauerstoff im arteriellen Blut sinkt deutlich ab, denn die Annahme, daß der Hämoglobingehalt des Blutes in den wenigen Stunden während der Fahrt gestiegen sei, ist wohl von der Hand zu weisen. Anders war es bei unseren Versuchen im Hochgebirge, wo durch vermehrten Hämoglobingehalt der verminderte Sauerstoffdruck ausgeglichen wurde; es bleiben also nur die 2 Möglichkeiten: Zufuhr größerer Blutmengen durch vermehrte Herzarbeit oder vermehrte Abgabe des Sauerstoffes aus dem Blut an das Gewebe, d. h. größere Sauerstoffverarmung des venösen Blutes. Während nun im Hochgebirge nach unseren Untersuchungen keine Abnahme des Sauerstoffgehaltes im venösen Blut eintrat, scheint das im Luftballon der Fall zu sein. Wir haben allerdings nur eine wahrscheinlich gültige Beobachtung an Kuhn (Nr. 6), bei dem die Sauerstoffspannung im venösen Blut von 31,2 auf 22,1 sinkt, der Sauerstoffgehalt von 12,0 auf 9,0. Außerdem wird wahrscheinlich auch das Herz zu vermehrter Arbeit herangezogen werden, wenn auch die Erhöhungen der Pulszahlen nicht ohne weiteres eine wahre Mehrleistung anzeigen, weil durch vermindertes Schlagvolumen die Leistungen entsprechend herabgesetzt sein könnten. Jedenfalls wäre es interessant, weitere Beobachtungen über das Verhalten des Sauerstoffgehaltes im venösen Blut und damit über die Herztätigkeit bei plötzlichem Anstieg in größere Höhe zu erhalten.

Über die sensibilisierende Wirkung der Porphyrine.

Von

Walther Hausmann.

(Aus der biologischen Versuchsanstalt der k. Akademie der Wissenschaften in Wien[1]).

(Eingegangen am 19. Juli 1914.)

Das Hämatoporphyrin gehört, wie schon vor längerer Zeit gezeigt wurde[2]), zu jenen optischen Sensibilisatoren, durch die Warmblüter (weiße Mäuse) bei gleichzeitiger Belichtung schwer geschädigt werden und rasch zugrunde gehen können. Seither hat Meyer-Betz[3]) in einem heroischen Selbstversuche die sensibilisierende Wirkung dieses Körpers auch für den Menschen bestätigt.

Es schien nun von Interesse, zu untersuchen, ob man diese Wirkung nicht derartig steigern könnte, daß die Tiere innerhalb einiger Minuten zugrunde gehen oder zumindest in Narkose versetzt werden können, so daß man mit einigem Rechte von einem „Lichtschlag" sprechen könnte, der die akuteste Form des von mir früher beschriebenen Lichttodes darstellen würde. Der Nachweis eines derartigen Lichtschlages war auch aus dem Grunde nicht unwichtig, weil manche Fälle von Sonnenstich vielleicht mit derartigen Sensibilisationsvorgängen zusammenhängen könnten.

Es ließ sich nun unter geeigneten Versuchsbedingungen zeigen, daß man in der Tat hochgradig sensibilisierte weiße

---

[1]) Ein kurzer Auszug dieser Arbeit erscheint im Sitzungsanzeiger der Akademie vom 9. VII. 1914 als Nr. 9 der Mitteilungen a. d. biologischen Versuchsanstalt der k. Akademie.

[2]) Diese Zeitschr. **14**, 275, 1908; ebenda **30**, 276, 1910; Strahlentherapie **3**, 112, 1913.

[3]) Deutsches Arch. f. klin. Med. **112**, 476, 1913.

Mäuse in einigen Minuten durch Licht in tiefe Narkose versetzen kann, in der sie zugrunde gehen (Versuch 1 und 2).

Während bei minder rascher Entwicklung der Krankheitserscheinungen, wie dies in den früher beschriebenen Versuchen der Fall war, hauptsächlich Symptome seitens der Hautoberfläche zu konstatieren waren, denen erst später die Erscheinungen des Zentralnervensystems folgten, stehen in diesen Versuchen die zentralen Symptome im Vordergrunde. Man beobachtet öfters, daß in diesen ganz rasch verlaufenden Fällen die Tiere sich gar nicht kratzen, sondern ganz rasch einen komatösen Eindruck machen, der manchmal von heftigen tetanischen Krämpfen unterbrochen wird. [Vgl. Hermann Pfeiffer[1])].

Besonders möchte ich hervorheben, daß die Symptome hochgradig mit Hämatoporphyrin sensibilisierter Tiere sofort mit Beginn der Bestrahlung ohne die allergeringste Inkubationszeit auftreten. Ungemein charakteristisch war dies in dem Versuche 3, wo in dem Momente, wo die Maus sich im Lichtkegel befand, auch schon der Symptomenkomplex voll entwickelt war. Auch Meyer-Betz hat in seinem Sensibilisationsselbstversuche mit Hämatoporphyrin „sofort heftiges Brennen der bestrahlten Teile“ gespürt. (Vgl. hierzu besonders Jesionek, Ergebn. d. inn. Med. 11, 525, 1913.)

Dies ist sehr deutlich im Vergleiche mit dem Verhalten der Tiere bei Bestrahlungen, die durch ultraviolette Strahlen schon an sich stark wirken, ohne daß es hierbei eines von außen zugeführten Sensibilisators bedarf, wie dies z. B. bei Verwendung der Quarzquecksilberdampflampe (Heräus) der Fall ist. Bestrahlt man eine Hämatoporphyrinmaus und ein normales Tier mit der eben genannten Lampe, so zeigen sich beim Hämatoporphyrintier wie immer nach kurzer Zeit die bekannten Hauterscheinungen; es treten Ödeme auf, und zwar in einer Ausdehnung und Stärke, wie ich sie sonst nur ganz selten beobachtet habe. Etwa 12 Stunden nach einer 1 bis 2 stündigen Bestrahlung mit der Quarzlampe ist, wenn man die Tiere nach der Belichtung im Dunkeln beließ, der von mir als subakut bezeichnete Symptomenkomplex des Hämatoporphyrintieres voll entwickelt;

---

[1]) Zeitschr. f. Imm. u. experim. Ther. 10, 550, 1911.

die normale Maus hingegen zeigt kaum eine Veränderung, nur daß sich die Ohren etwas röten und die Augen ab und zu verkleben. Nach einigen Tagen ist jedoch das Bild der sensibilisierten und der normalen Maus ähnlicher geworden. Bei beiden Tieren sind die Ohren nekrotisch, sie zeigen haarlose Ringe um die Augen, Erscheinungen, wie sie beim sensibilisierten Tiere ja vielfach beschrieben wurden (Raab, Jodlbauer und Busk, Hausmann u. a. m.), bei diesen Tieren aber unverkennbar deutlicher sind als beim nicht sensibilisierten Tiere (Versuch 4). Die Nekrosen treten meist früher auf und ergreifen größere Anteile der Ohrmuschel, die haarlosen Ringe um die Augen sind größer, auch ist Haarausfall bei diesen Tieren zu beobachten. Früher war mitgeteilt worden, daß es schwer gelinge, die chronische Form der Sensibilisationskrankheit (Nekrosen, Haarausfall) bei Hämatoporphyrinmäusen zu erzielen, da die Tiere meist infolge der Belichtung zugrunde gehen. Wurde aber [mit Tageslicht, Projektionsbogenlampe (Filter mit Glasplatten)] zu wenig intensiv bestrahlt, so trugen die Tiere keine dauernde Schädigung davon. Bei Bestrahlung von Hämatoporphyrinmäusen mittels der Quarzquecksilberdampflampe ist die „chronische Form“ nun ganz sicher zu erhalten, selbstverständlich ist diese Wirkung zum Teil den ultravioletten Strahlen zuzuschreiben.

Es hat den Anschein, als ob sich die Wirkung der ultravioletten Strahlen und der für die Hämatoporphyrintiere wirksamen [von λ 580 bis 490 $\mu\mu$[1])] addiere, denn zum Zustandekommen der Krankheitserscheinungen bei belichteten Hämatoporphyrintieren scheinen ultraviolette Strahlen nicht nötig zu sein. Dies geht, abgesehen von meinen früheren Befunden, auch daraus hervor, daß ich die akute und subakute Form durch Bestrahlung mittels einer 3000kerzigen $^1/_2$-Watt-Osramglühlampe mit entsprechender Kühlung (Glasgefäße) bei Hämatoporphyrinmäusen erzielen konnte.

Zu bemerken ist ferner in diesem Zusammenhange, daß bei einer Maus, die stark mit Hämatoporphyrin sensibilisiert war, schon nach 15 Minuten dauernder Bestrahlung (Quarzlampe) Nekrose eines großen Teiles des Ohres eintrat, während ich dies bei den nicht sensibilisierten Kontrollmäusen nicht beobachten konnte (Versuch 5).

---

[1]) Diese Zeitschr. 30, 303, 1910.

Sehr charakteristisch sind beim sensibilisierten wie beim nicht sensibilisierten Tiere die bei letzteren schon beobachteten hypertrophischen Wucherungen des übriggebliebenen Ohrknorpels [Pürkhauer[1]), Jansen[2])], die mir beim sensibilisierten Tiere ganz ungemein stark zu sein schienen.

H. Fischer und F. Meyer-Betz[3]) haben zuerst die photodynamische Wirkung des Mesoporphyrins studiert, weiter hat H. Fischer[4]) mit seinen Mitarbeitern in den grundlegenden Arbeiten über die Porphyrinbildung insbesondere das biologische Verhalten des Porphyrinogens untersucht. Denn es war diesen Autoren gelungen, durch Einwirkung von Eisessigjodwasserstoff auf Hämin in Gegenwart von Jodphosphonium ein farbloses Derivat, die Leukobase des Hämatoporphyrins, Porphyrinogen zu erhalten.

Bei dem Studium der sensibilisierenden Wirkung des Mesoporphyrins an weißen Mäusen hatten H. Fischer und Meyer-Betz bei Versuchen mit reinstem Mesoporphyrin keine sensibilisierende Wirkung feststellen können. Spätere Untersuchungen H. Fischers und seiner Mitarbeiter E. Bartholomäus und H. Röse, die an Meerschweinchen unternommen wurden, ergaben, daß Hämatoporphyrin im Lichte die stärkste Wirkung hatte. Mesoporphyrin hatte in der Mehrzahl der Fälle keine Spur sensibilisierend gewirkt, in einem Falle schwach, in einem deutlich. Krankheitserscheinungen sind jedoch nicht zutage getreten, die Lichtscheu fehlte, im Dunkeln verschwanden die Symptome sehr bald.

Porphyrinogen wirkte intensiv sensibilisierend, und zwar in allen untersuchten Fällen. Die Leukobase gelangt aber erst nach längerem Verweilen im Organismus zur Wirkung.

Das verschiedene biologische Verhalten des Hämatoporphyrins und des Mesoporphyrins ist, wie H. Fischer und Meyer-Betz betonen, von Wichtigkeit, weil bisher noch nicht festgestellt ist, ob im menschlichen Harn bei Porphyrinurie Hämatoporphyrin oder Mesoporphyrin ausgeschieden wird.

---

1) Arch. f. Derm. u. Syph. **81**, 354, 1907.

2) Ebenda **90**, 45, 1908.

3) Zeitschr. f. physiol. Chem. 82.

4) Ebenda **84**.

Es schien mir nun von Interesse, diese Untersuchungen mit Mesoporphyrin auch an Paramäcien und Erythrocyten aufzunehmen, da ich vor längerer Zeit zeigen konnte, daß diese Versuchsobjekte durch Hämatoporphyrin leicht zu sensibilisieren sind[1]). Mit einem Präparat von krystallisiertem Mesoporphyrin, das ich der besonderen Liebenswürdigkeit des Herrn Privatdozenten Dr. Hans Fischer in München verdanke, gelang es nachzuweisen, daß dies Präparat auf Paramäcien deutlich, auf rote Blutkörperchen ungemein intensiv photodynamisch wirkt (Versuch 6).

So besteht in dieser photodynamischen Wirkung des Mesoporphyrins gegenüber Erythrocyten und Paramäcien kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu Hämatoporphyrin. Es ist also prinzipiell auch eine Sensibilisationsmöglichkeit des Warmblüters mittels Mesoporphyrin denkbar, wie dies ja auch von H. Fischer und seinen Mitarbeitern in einigen Versuchen beobachtet wurde.

Nachstehend sind einzelne Versuchsprotokolle wiedergegeben. Hämatoporphyrin wurde mit Hp. abgekürzt.

Versuch 1.

Zur Erzielung des Lichtschlages wurden weiße Mäuse zunächst nach dem Vorgange von F. Reach[2]) depiliert, hierauf mit Hp. subcutan sensibilisiert. Die Belichtung wurde in der Sonne vorgenommen, da ich aus früheren Versuchen wußte, daß das Sonnenlicht ungemein stärker wirkt als Kohlenbogenlicht.

Mit einem Planspiegel wurden die Sonnenstrahlen mittels einer plankonvexen Linse durch die den Zeißschen Projektionsapparaten beigegebene Kühlkammer, die mit Wasser gefüllt war, geleitet. In dem Lichtkegel, möglichst weit vor dem Focus, wurde die Maus exponiert[3]).

10. VI. 1914. Maus, 9,8 g, erhält 0,07 g Hp. um 10 Uhr. Im Dunkeln bis 10^{57}. Dann belichtet. Sofort komatöser Eindruck, ab und zu Kratzversuche, die derart unterbrochen werden, daß die zum Kratzen erhobene Pfote in der Luft unbeweglich gehalten wird.

11^{06} Rückenlage, vermag sich noch umzudrehen.

11^{10} Rückenlage, keine Cornealreflexe. Stärkste Dyspnoe.

11^{21} tot. Temperatur des Tieres (After) 34°, Temperatur des Gefäßes 29°. Kontrolle ohne jeden Schaden in demselben Gefäße von 11^{45} bis 12^{20}.

---

1) Diese Zeitschr. **30**, 281, 1910.

2) Zeitschr. f. b. Techn. u. Meth. **2**, 310, 1912.

3) Bei dieser Versuchsanordnung folgte ich zum Teile einem Rate von Herrn Priv.-Doz. Dr. L. Freund.

Versuch 2.

10. VI. Dieselbe Versuchsanordnung. Weiße Maus, 20 g, erhält 0,01 g Hp. um 10 Uhr.

Beginn der Belichtung 12^{22} (leichter Wolkenschleier).

12^{29} taumelt somnolent. Es macht den Eindruck, als wolle sich das Tier kratzen, würde aber daran verhindert.

12^{32} vorübergehende Rückenlage, Krämpfe.

12^{41} Seitenlage, Dyspnoe.

12^{44} keine Cornealreflexe, tiefstes Koma, verendet gegen 1^h. Temperatur des Tieres 35°, Temperatur des Gefäßes 30°.

In zwei weiteren Fällen waren die Tiere nach 5 Minuten ohne Cornealreflexe und in 15 Minuten nach Beginn der Belichtung tot. Da aber die Kontrollen in diesen Fällen nach $^1/_2$ Stunde plötzlich eingingen, ist hier Wärmewirkung nicht ausgeschlossen.

Versuch 3.

27. VI. Maus, 15 g, 0,01 Hp. um 10 Uhr. Im Dunkeln bis 11 Uhr. Versuchsanordnung wie oben. Helle Sonne.

Maus in den Lichtkegel gestellt um 11^{12}. Bevor es mir möglich ist, zu protokollieren, allerheftigster Kratzanfall.

11^{14} somnolent.

11^{16} krampfhafte, unkoordinierte Sprünge.

11^{17} Sonne versteckt sich, Versuch abgebrochen.

Versuch 4.

17. II. 1914. Weiße Maus, 22 g, erhält um 4 Uhr 0,01 g Hp. in schwach alkalischer Lösung, eine andere Maus, 20 g, 1 ccm NaCl 0,92 %. Dann in einer Entfernung von 15 cm einer Quarzquecksilberdampflampe Heräus) von 4 bis 5 Ampère ausgesetzt. Kontrolle der Temperatur mit Schwarz- und Blankkugelthermometer. Am Ende der Bestrahlung Temperatur des Bestrahlungsgefäßes: Schwarzkugelthermometer 30°.

Beginn der Bestrahlung 4^{37}. Ende 5^{37}. Das Hp.-Tier zeigt bald deutliche Symptome von Sensibilisation, heftige Anfälle, Kratzen usw. Nach der Bestrahlung kommen beide Tiere ins Dunkle. 7^h Hp.-Tier Ödem. Das normale Tier hat schwach gerötete Ohren.

28. II. Hp.-Tier Typus eines ausgesprochenen subcutanen Falles, bei anderen künstlichen Lichtquellen hatte ich derartige Fälle bisher nie beobachtet.

Die Ohren des Kontrolltieres kaum gerötet.

19. II. Hp.-Tier. Ohren nach vorne gerichtet, beginnen nekrotisch zu werden. Kontrolle: Ohren stark hyperämisch, nicht nach vorne gerichtet, Augen verklebt.

20. II. Hp.-Tier Nekrose der Ohren, ebenso bei den Normalen beginnende Nekrose der Ohren.

In den nächsten Tagen fallen die Ohren des Hp.-Tieres fast ganz ab, die des normalen großenteils. Die Tiere haben beide haarlose Ringe um die Augen. Hp.-Tiere und Normaltier sehen sich nunmehr

ziemlich ähnlich, doch sind die Veränderungen bei dem Hp.-Tiere viel ausgesprochener.

Versuch 5.

23. II. 1914. Eine Maus, 24 g, erhält 0,005 Hp. Nach 1 Stunde bestrahlt durch 15 Minuten (Quarzlampe), ebenso zwei Kontrollen. Hp.-Tier Anfälle.

24. II. Die normalen Tiere zeigen kaum Rötung, Hp.-Tier deutliche Rötung und Ödem der Ohren.

16. III. Hp.-Tier ein Ohr zum Teil nekrotisch, das andere hyperämisch. Die Kontrollen haben ganz blasse, ungeschädigte Ohren.

Versuch 6.

I. Versuche mit Mesoporphyrin an roten Blutkörperchen.

a) 26. VI. 1914. 0,1 g salzsaures Mesoporphyrin wird in 5 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH und 5 ccm NaCl (0,9 $^{0}/_{0}$) suspendiert.

27. VI. nicht alles gelöst, 1 ccm der Suspension auf 100 ccm NaCl 0,9 $^{0}/_{0}$ aufgefüllt (Lösung I).

Zum Versuche wird 1 $^{0}/_{0}$ Aufschwemmung von Rattenblutkörperchen (zweimal gewaschen) verwendet. Zu je 5 ccm der Erythrocytensuspension wird 0,1 bis 0,5 der Lösung I hinzugefügt, hierauf die Proben geteilt. Ein Teil belichtet (Sonne, starke Wasserkühlung), eine Hälfte im Dunkeln belassen.

Menge der zugesetzten Lösung I ccm	Menge der Blutkörperchen-suspension ccm	Bemerkungen	
		Im Licht	Im Dunkeln
0,1	5	Komplette Hämolyse nach 17 Min.	Keine Hämolyse nach $2^{1}/_{2}$ Std.
0,2	5	do. „ 17 „	
0,3	5	do. „ 9 „	
0,4	5	do. „ 7 „	
0,5	5	do. „ 4 „	

b) 27. VI. 0,01 g freies Mesoporphyrin mit einigen Tropfen $^{n}/_{10}$-NaOH aufgeschwemmt mit 0,9 $^{0}/_{0}$ NaCl auf 100 ccm aufgefüllt.

26. VI. nicht alles gelöst (Lösung II). Versuch wie bei a. Helle Sonne 30. VI.

Menge der zugesetzten Lösung II ccm	Menge der Blutkörperchen-suspension ccm	Bemerkungen	
		Im Licht	Im Dunkeln
0,1	5	Komplette Hämolyse nach 18 Min.	Nach 4 Stunden negativ
0,2	5	do. „ 15 „	
0,3	5	do. „ 10 „	
0,4	5	do. „ 7 „	
0,5	5	do. „ 7 „	
1,0	5	do. „ 4 „	

Versuche mit Meerschweinchenblut ergaben dasselbe Resultat. Nach längerer Zeit werden auch Dunkelproben etwas hämolysiert. Ein Verhalten, das möglicherweise auf die Verwendung von $^{n}/_{10}$-NaOH zurückzuführen ist. Ähnliches hatte ich früher auch bei Phylloporphyrin beobachtet.

II. Versuche mit Mesoporphyrin an Paramaecien.

a) Lösung I (s. oben).

30. VI. Versuch in schwacher Sonnenbestrahlung; starke Wasserkühlung.

Menge der zugesetzten Lösung I ccm	Menge der Paramaecien-aufschwemmung ccm	Bemerkungen	
		Im Lichte	Im Dunkeln
0,1	5	Nach 14 Min. leben viele	Bleiben leben
0,2	5	„ 14 „ „ „	
0,3	5	fast alle tot	
0,4	5	alle tot	
0,5	5	„ „	

b) Lösung II (s. oben).

30. VI. Versuch mit heller Sonne.

Menge der zugesetzten Lösung ccm	Menge der Paramaecien-aufschwemmung ccm	Bemerkungen	
		Im Licht	Im Dunkeln
0,1	5	Nach 7 Min. viele tot	Bleiben leben
0,2	5	Nach 7 Min. alles tot	
0,3	5	„ 7 „ „ „	
0,4	5	„ 7 „ „ „	
0,5	5	Nach 5 Min. alles tot	
1,0	5	„ 4 „ „ „	

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lauten:

1. Es gelingt, mit Hämatoporphyrin sensibilisierte weiße Mäuse bei geeigneter Versuchsanordnung durch intensives Licht in einigen Minuten in tiefste Narkose zu versetzen, in der die Tiere verenden. Diese akuteste Form des Lichttodes könnte als „Lichtschlag“ bezeichnet werden.

2. Mit Hämatoporphyrin sensibilisierte Tiere zeigen, in helles Licht gebracht, sofort die Symptome der Sensibilisation ohne jede Inkubationszeit.

3. Durch Bestrahlen von Hämatoporphyrinmäusen mittels der Quarzlampe lassen sich die chronischen Formen der Hämatoporphyrinsensibilisierung besonders deutlich und konstant

hervorrufen. Allerdings ist auch das ultraviolette Licht an sich bei diesen Veränderungen beteiligt.

4. Kurzdauernde, an sich unwirksame Bestrahlung von Hämatoporphyrinmäusen mit der Quarzlampe führt bei diesen Tieren zu Nekrosen.

5. Mesoporphyrin wirkt photodynamisch auf Paramaecien und Erythrocyten. Die sensibilisierende Wirkung für diese Versuchsobjekte ist demnach bei Hämatoporphyrin, Mesoporphyrin und Phylloporphyrin[1]) [für diesen letzteren Körper nur für Erythrocyten nachgewiesen] vorhanden.

---

[1]) Diese Zeitschr. **16**, 302, 1909.

Zur Theorie der Klärung und Reinigung der Abwässer.

Von

P. Rohland, Stuttgart.

(Eingegangen am 21. Juli 1914.)

Zwar hat schon Justus von Liebig die ersten orientierenden Versuche auf dem Gebiete der Abwässerklärung und Reinigung gemacht, aber späterhin hat sich die chemische Wissenschaft, die nach anderen Zielen strebte, sich so wenig um dieses Arbeitsfeld gekümmert, daß die Analysen vieler Fabrikabwässer und der schädigenden Substanzen in ihnen jetzt noch nicht bekannt sind.

Bestimmt werden jetzt in den Abwässern quantitativ meist die Mengen der Schwebestoffe, die Menge der oxydierbaren Substanz, des Stickstoffs, ev. des Zuckers, die Menge der Chloride.

Indessen genügt das noch nicht; vor allen Dingen müssen die schädlichen kolloiden Substanzen bestimmt werden. Eine einfache Methode, diese zu bestimmen, die darauf beruht, daß Kolloide leicht kompliziert zusammengesetzte Farbstoffe, wie Anilinfarbstoffe, adsorbieren und schließlich auf colorimetrischem Wege ausgeführt wird, habe ich angegeben[1]).

Die Begriffe der Klärung und Reinigung des Abwassers sind streng auseinanderzuhalten. Die Klärung soll die festen, kleinen Bestandteile, die Schwebestoffe beseitigen, während die Reinigung alle schädlichen Substanzen, die kolloidgelösten Stoffe, die Farbstoffe, die Fette, Öle usw., den üblen Geruch entfernen soll.

Zum Zwecke der Klärung sind Absitzbecken eingerichtet worden; man findet sie häufig noch in die Erde eingegraben und gleichmäßig 1 m tief, so daß leicht Verschlam-

---

[1]) Kolloid-Zeitschr. **1913**, 1.

mung eintritt; sind Querwände errichtet, so darf das Abwasser nicht seitlich vorbei in das nächste Becken laufen, weil dann selbst noch gröbere Bestandteile mitgeführt werden. Am Einfluß des Abwassers müssen die Absitzbecken jedesmal 2 m Tiefe haben, damit die Sedimentation der Schwebestoffe besser erfolgen kann, am Ausfluß des Abwassers 1 m.

Am besten werden die Absitzbecken aus Stampfbeton hergestellt, schon der viel leichteren Reinigung wegen, mit schräg verlaufenden Seitenwandungen und schräg verlaufenden Böden, ferner mit immer niedriger werdenden Querwandungen, die in der Höhe um etwa 20 bis 40 cm abnehmen, damit das geklärte und gereinigte Abwasser bequem in das nächste Absitzbecken überlaufen kann.

Sind aber die Abwasser sauer oder zuckerhaltig, so müssen die Innenwandungen der Absitzbecken mit säurebeständigem Steinzeug, mit Knauffschen Platten, wie sie die Deutsche Steinzeugwarenfabrik für Kanalisation und chemische Industrie in Friedrichsfeld in Baden herstellt, bekleidet werden.

Aber ohne einen sedimentierenden Zusatz, z. B. ohne Kolloidton, erfolgt trotz alledem das Absitzen der festen Bestandteile ganz ungenügend. Zunächst kann durch einen Zusatz eine rein mechanische Sedimentierung erzielt werden; enthält z. B. ein Abwasser außer kleinen, festen Bestandteilen SO_4-Ionen, und erfolgt ein Kalkzusatz, so reißt der sich bildende und fällende Gips auch die festen, kleinen Bestandteile mit zu Boden, und so wird eine Klärung des Abwassers herbeigeführt.

Auch der umgekehrte Fall ist möglich, daß Kalksalze in dem Abwasser vorhanden sind, die durch Zusatz von SO_4-Ionen zur Bildung von Gips führen. Bei solchen mechanischen Klärungen ist also eine genaue Kenntnis der Bestandteile des Abwassers nötig.

Wie nun schon erwähnt, hatte bereits Justus von Liebig Elektrolytzusätze vorgeschlagen, und zwar Calcium-, Aluminium- und Eisenverbindungen, die in der Tat eine starke sedimentierende Wirkung ausüben. Die Ursachen dieses Verhaltens waren damals nicht bekannt; jetzt lassen sie sich auf kolloidchemischer Grundlage in großen Zügen wenigstens angeben.

Die in städtischen und Fabrikabwässern enthaltenen schädlichen Bestandteile sind größtententeils kolloidgelöste und kolloidveranlagte Substanzen und *elektronegativ*. Tritt nun zu diesen ein elektrisch positives Anion bestimmter Art, wie $Ca^{\cdot\cdot}$, $Al^{\cdot\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot}$, so werden die kolloidgelösten und kolloidveranlagten Teilchen *koaguliert*, es entsteht eine lebhafte Bewegung im Abwasser, die die Teilchen von unten nach oben und in umgekehrter Richtung treibt; sie ballen sich zu größeren Flocken zusammen und sinken rasch zu Boden.

Dieser Elektrolytzusatz ist aber nur dann wirksam, wo Kolloide, ja sogar ganz bestimmte Kolloide in dem Abwasser enthalten sind; er eignet sich also keinesfalls zur Klärung von Abwässern, die selbst viel Elektrolyte enthalten, wie das bei den meisten *anorganischen Abwässern* der Fall ist. Dagegen ist er anwendbar für Abwässer der Gerbereien bzw. Lederfabriken, Brauereien, Brennereien, Molkereien, Preßhefebriken usw.

Es kann aber auch vorkommen, daß bei Fabrikwässern, die Kolloide enthalten, auf Zusatz des Ions $Ca^{\cdot\cdot}$ oder $Al^{\cdot\cdot\cdot}$ die Koagulation und somit die Klärung *ausbleibt*, da diese Ionen erstere nicht herbeizuführen vermögen.

Daher ist es vorgekommen, daß der von den Behörden besonders empfohlene *Kalkzusatz* zum Abwasser nicht nur vollständig unwirksam war, sondern sogar, wenn er im Überschuß zugesetzt wurde und in den Vorfluter gelangte, *schädlich* wirkte, indem er sein Wasser verhärtete. So waren allmählich diese Zusätze von Kalk-, Aluminium- und Eisenverbindungen in Mißkredit gekommen.

Jetzt läßt sich aber sagen, daß in einem Abwasser, das elektronegative Kolloide enthält, ein *elektropositives Kation* eine fällende und koagulierende Wirkung ausübt, während in einem Abwasser, das elektropositive Kolloide führt, ein *elektronegatives Anion*, z. B. das Hydroxylion, die gleiche Wirkung besitzt.

Es scheint, daß in bezug auf die wirksamen Kationen dabei das *periodische System* eine Rolle spielt, indem die Kationen fast aller Elemente der zweiten Reihe: $Mg^{\cdot\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$, $Ba^{\cdot\cdot}$, $Sr^{\cdot\cdot}$ eine sedimentierende Wirkung ausüben, ferner einige der dritten Reihe, wie das $Al^{\cdot\cdot\cdot}$-Ion, und in der achten Reihe

das Ferriion; bei den Eisensalzen ist die Valenz auch noch von Bedeutung.

Die Kationen der anderen Schwermetalle, Pb¨ usw., sind nur in besonderen Fällen anwendbar.

Die Klärung der städtischen Abwässer erfolgt meistens in sog. Emscher- und Kremerbrunnen, auf rein mechanischem Wege ohne jedes Zusatzmittel.

Diese Klärung ist aber, wie schon oben erwähnt, ganz unvollkommen; es werden nur die gröberen Bestandteile der Abwässer zum Absitzen gebracht, während die kleineren und kleinsten festen Bestandteile, ferner die kolloid gelösten Substanzen, die Farbstoffe des Urins und der Fäkalien in den Vorfluter gelangen, wo sie nun doch die Fischzucht schädigen und Seuchen verbreiten helfen können. Daß kolloid gelöste Stoffe in dem Ausfluß des Abwassers in den Vorfluter enthalten sind, erkennt man leicht an der andauernden starken Schaumbildung, die nur Abwässer hervorrufen, die viel Kolloide enthalten[1]).

Mit Hilfe dieser Brunnen ist also auch die Reinigung der städtischen Abwässer eine unvollkommene; es ist daher unbedingt eine Nachklärung entweder nach meinem „Kolloidtonreinigungsverfahren"[2]) oder nach dem biologischen Verfahren notwendig; bei letzterem auch noch eine Nachreinigung, welche die Entfernung von Trübungen bezweckt, die durch die Bakterien hervorgerufen werden.

Die Reinigung der städtischen und Fabrikabwässer bezweckt die Entfernung aller in ihnen enthaltenen schädlichen Substanzen, allzu zahlreicher anorganischer Salze, wie in den Endlaugen der Kaliwerke, der organischen und anorganischen Farbstoffe, der künstlichen, pflanzlichen und tierischen Farbstoffe, der Kolloide und Öle usw.

In den Farbwerken kann zum Teil Entfärbung der Farbstoffe im Abwasser dadurch erzielt werden, daß Schwefelsäure hinzugesetzt wird; es erfolgt dann eine Reduktion der Farbstoffe. Eine Entfernung der Farbstoffe aus dem Abwasser auf kolloidchemischem Wege durch Adsorption besorgt der Kolloidton.

---

[1]) Vgl. P. Rohland, Der kolloide und krystalloide Zustand der Materie. Stuttgart 1910.

[2]) Vgl. Chem. Ind. **1910**; Kolloid Zeitschr. **1912**.

Aus der Theorie der Klärung und Reinigung der Abwässer ergibt sich, daß das „Kolloidtonreinigungsverfahren" sich vortrefflich eignet zur Klärung und Reinigung der Abwässer der Textilwerke, der Farbwerke, Papier- und Pappenfabriken, der Lederfabriken, der Brauereien, Brennereien, Molkereien, Preßhefefabriken, Rohrzuckerfabriken usw. und zur Nachklärung und Nachreinigung der städtischen Abwässer, daß es aber da nicht anwendbar ist, wo es sich darum handelt, anorganische Salze, die in größerer Konzentration vorhanden sind, aus dem Abwasser zu entfernen, z. B. aus den Endlaugen der Kaliwerke.

Diese enthalten außer Chlornatrium, Chlorkalium, Magnesiumsulfat in kleinen Mengen 29% Magnesiumchlorid. Aber es läßt sich jetzt doch ein Weg schon erkennen, auf dem eine Reinigung der Endlaugen möglich erscheint.

Auch die Ablaugen der Sulfitcellulosefabriken, die ebenso wie die Endlaugen bisher kein brauchbares Reinigungsverfahren hatten, lassen sich mit Hilfe des Kolloidtons reinigen, sogar läßt sich der braune Farbstoff, dessen Konstitution noch nicht näher bekannt ist, entfernen, nachdem er durch Oxydation und Zusatz von Eisensalzen in kolloides Berlinerblau übergeführt worden ist.

Auch auf dem Gebiete der Abwasserreinigung und -klärung können theoretische Untersuchungen zu weiteren praktischen Erfolgen führen.

Beitrag zur Entstehungsweise des O. Loewischen Pupillenphänomens.

Von

A. Loewy und S. Rosenberg (Berlin).

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 19. Juli 1914.)

Im Jahre 1908 veröffentlichte O. Loewi[1]) eine Beobachtung, wonach die Einträufelung von Adrenalin in den Bindehautsack von Hunden und Katzen nach Pankreasexstirpation eine Pupillenerweiterung hervorruft, die bei normalen Tieren nicht zustande kommt. Loewi erklärt diese Mydriasis auf Grund der experimentell erwiesenen Tatsache, daß auf die Erweiterung der Pupille zweierlei mit dem Nervus sympathicus zusammenhängende Kräfte Einfluß haben: ein fördernder, d. h. den Dilatator erweiternder und ein diese Erweiterung hemmender. Letzterer geht vom Ganglion cerviale superius aus und wird durch Inaktivierung dieses Ganglions aufgehoben. — Den Gegensatz, der sich zwischen normalen und des Pankreas beraubten Tieren findet, erklärt Loewi durch die Annahme, daß vom Pankreas hemmende Wirkungen auf den Sympathicus ausgehen, deren Wegfall nach Exstirpation dieser Drüse genau so wirkt wie eine Ausschaltung des Ganglion cervicale superius, d. h. nach Adrenalineinträufelung in den Bindehautsack des Auges eine Pupillenerweiterung zustande kommen läßt.

Gelegentlich anderer Untersuchungen fiel uns auf, daß das Loewische Phänomen auch bei erhaltenem Pankreas unter gewissen Verhältnissen zustande kommen kann. Eine weitere Verfolgung des Gegenstandes ergab uns nun, daß die Adrena-

[1]) O. Loewi, Über eine neue Funktion des Pankreas usw. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 59, 83, 1908.

linmydriasis überall da eintrat, wo wir eine Hyperglykämie erzeugten. So fand sie sich nach Einspritzungen größerer Mengen von Thyreoglandol und Pituglandol, die, wie der eine von uns (R.) feststellen konnte, Hyperglykämie zustande bringen, ferner nach Injektion von Brenztraubensäure, die nach Paul Mayer[1]) gleichfalls zur Hyperglykämie und auch zur Glycosurie führt. — Beobachtet wurde sie weiter nach kombinierter Einspritzung von Morphin und Thyreoglandol (bzw. Pituglandol), deren steigernder Effekt auf Blutzucker mit Auftreten von Glycosurie wir selbst[2]) beschrieben haben.

Alle diese Beobachtungen erweckten in uns die Frage, ob nicht die Hyperglykämie als solche mit dem Loewischen Phänomen in ursächliche Verbindung zu bringen sei. Und in der Tat stellte es sich heraus, daß durch Zuckerüberladung des Körpers hervorgerufene Hyperglykämie bei normalen Tieren Mydriasis auf Adrenalineinträufelung zustande kommen läßt. —

Von Versuchen an Kaninchen sahen wir bis auf zwei orientierende, die positiv ausfielen, ab, da bei diesen Tieren Mydriasis nach Adrenalininstallation auch ohne jede weitere Beeinflussung aufzutreten pflegt. Alle übrigen Versuche wurden an Hunden ausgeführt. Die Zuckerzufuhr geschah entweder intravenös, wobei wir stets Anästhesierung des Operationsfeldes mittelst Novocain-Kochsalzinjektion herbeiführten[3]), oder per os durch Sondeneinführung in den Magen. Bei der intravenösen Injektion ließen wir innerhalb 4 bis 5 Minuten 50 bis 60 ccm einer Lösung von 25 g Dextrose in 80 g H_2O einlaufen; bei der Zufuhr per os wurden 100 bis 125 g Dextrose in 200 g Wasser gelöst in den Magen eingegossen. Leider sind nicht alle Hunde gegen die Eingießungen unempfindlich; fast alle erbrachen einen mehr oder weniger großen Teil der Zuckerlösung sofort oder nach mehr oder weniger langer Zeit. Ist bis zum Eintritt des Erbrechens genügend resorbiert worden, so kann die Mydriasis trotzdem noch eintreten.

[1]) P. Mayer, Über Brenztraubensäure-Glucosurie usw. Diese Zeitschr. 40; Derselbe, Weitere Untersuchungen usw. Diese Zeitschr. 49.

[2]) A. Loewy und S. Rosenberg, Über eine eigentümliche Art von Glycosurie. Diese Zeitschr. 61, 189, 1914.

[3]) A. Loewy und S. Rosenberg, Über die normale Höhe des Blutzuckergehalts usw. Diese Zeitschr. 56, 114, 1913.

Neben den Versuchen mit Zuckerzufuhr führten wir noch eine Reihe weiterer mit intravenöser Infusion von Kochsalzlösungen aus, um zu entscheiden, ob etwa bei den Zuckerversuchen die Hypertonie der Lösung das die Mydriasis auslösende Moment sei. Wir benutzen der Zuckerlösung isosmotische NaCl-Lösungen. Dabei ergab sich, daß Injektionen mäßiger Mengen, bis zu 50 ccm, bei mittelgroßen Hunden von annähernd 10 kg Gewicht keinen Effekt hatten. Dagegen war nach Einlauf von **150 ccm** der NaCl-Lösung das Pupillenphänomen meist positiv. Blutzuckerbestimmungen in diesen Versuchen zeigten, daß der Blutzuckergehalt hier über die Norm erhöht war. In einem Falle, wo auch bei dieser hohen Kochsalzdosis das Pupillenphänomen zur Zeit der Blutentnahme negativ war, erwies sich auch der Blutzuckergehalt als normal.

Bezüglich des Verhaltens der mit großen NaCl-Mengen infundierten Tieren möchten wir bemerken, daß bei allen auffiel: lebhafter Durst, Drang zu Stuhl- und Urinentleerung und starke fibrilläre Zuckungen fast der gesamten Rumpf- und Extremitätenmuskulatur.

Für die Anstellung der Versuche ist wichtig zu beachten, daß nach wiederholten Adrenalininstallationen zunächst ein Zustand eintreten kann, bei dem nach neuer Zuckerüberladung auch ohne neue Adrenalineinträufelung Mydriasis auftritt. Bei weiterer Fortsetzung der Instillationen kommt dann ein Stadium, in dem im Gegensatz zu dem Vorhergehenden eine Unempfindlichkeit eintritt, derart, daß neue Zuckerzufuhr keine Wirkung mehr auf das Auge hat. Gegen diese Störungen schützten wir uns — nachdem wir sie erkannt hatten — dadurch, daß wir nicht an aufeinander folgenden Tagen die Tiere in den Versuch nahmen, vielmehr ca. 8 Tage bis zu einem neuen Versuch vergehen ließen, wobei wir dann wieder normale Verhältnisse antrafen.

Für die Feststellung der Pupillenreaktion ist zu beachten, daß sie nur in einem Teil der Fälle längere Zeit in ausgeprägter Weise anhält, so daß sie auch oberflächlicher Betrachtung nicht entgehen kann. In anderen Fällen ist sie vorübergehend, so daß eine genaue, fortlaufende Besichtigung der Tiere notwendig ist, um sie nicht zu übersehen. — Zuweilen ist die Erweiterung unter allen Umständen sichtbar, zuweilen nur

bei Ausschluß der akkomodativen Tätigkeit des Auges für die Nähe.

Unsere Blutzuckerbestimmungen wurden an dem nach Rona-Michaelis enteiweißten Blute polarimetrisch ausgeführt.

Infusionsversuche.

a) Mit Dextroselösungen.

Versuch 1.

22. V. 14. Kaninchen von ca. 2 kg erhält einige Tropfen Epirenan ins r. Auge instilliert. Danach keine Differenz der Pupillen. Injektion von 10 ccm einer 45 % igen Dextroselösung in eine l. Ohrvene. Danach sofort zweite Instillation einiger Tropfen Epirenanlösung (1:1000) ins r. Auge. — Fünf Minuten nach der Infusion sehr deutliche Erweiterung der r. Pupille.

Versuch 2.

22. V. 14. Kaninchen von 2,35 kg erhält Epirenan ins r. Auge. Danach keine Pupillendifferenz. Infusion von 10 ccm 45 % iger Dextroselösung in eine l. Ohrvene. Gleich danach zweite Epirenaninstillation. 5 Minuten nach der Infusion ist r. Pupille erweitert und r. Bulbus vorgetrieben. Eine nach 24 Stunden wiederum ausgeführte Einträufelung von Epirenan ins r. Auge blieb ohne Wirkung auf die Pupille.

Versuch 3.

23. V. 14. Hund Wolf von 9 kg. Epirenaneinträufelung ins r. Auge bleibt ohne Wirkung auf die Pupille. Infusion von 50 ccm einer 31 % igen Dextroselösung in die l. Vena jugular. extern. unter Lokalanästhesie. Danach sofort neue Epirenaninstillation. Eine Viertelstunde nach der Infusion deutliche Erweiterung der r. Pupille.

Versuch 4.

28. V. 14. Hund Fritz erhält 62 ccm eine 31 % igen Dextroselösung in die l. Vena jugular. extern. infundiert. Nach 5 Minuten Epirenan ins r. Auge. 14 Minuten nach dem Einlauf deutliche Erweiterung der r. Pupille.

Versuch 5.

29. V. 14. Hund Fritz erhält 70 ccm der 31 % igen Zuckerlösung in die r. Vena jugular. extern. Vor und nach der Infusion Epirenaninstillation ins l. Auge. 7 Minuten nach der Infusion l. Pupille weiter als r.; verhält sich so 15 Minuten lang.

Versuch 6.

9. VI. 14. Hund Wolf (der bereits am 27. V., am 2. VI. nnd 5. VI im Versuch war) erhält 60 ccm 31 % ige Dextroselösung in die r. Vena femoral. Danach Epirenan ins l. Auge. Hund ist nach der Infusion sehr

aufgeregt, rennt dauernd in größter Unruhe umher. Keine Wirkung auf die Pupille.

Versuch 7.

18. VI. 14. Hund Paul (der schon am 8., 15. u. 17. VI. zum Versuch diente) erhält in die l. Vena jugular. extern. 75 ccm der 31 % igen Dextroselösung. Vor- und nachher Epirenan ins l. Auge. Bis zu 27 Minuten keine Wirkung.

Versuch 8.

25. VI. 14. Hund Paul erhält 63 ccm der 31 % igen Dextroselösung in die r. Vena jugular. Vor- und nachher Epirenan ins r. Auge. 7 Minuten nach der Infusion ist die r. Pupille größer als die linke. Ebenso auch noch 10 Minuten später (jedoch nicht beim Akkomodieren).

Versuch 9.

6. VII. 14. Hund Männe erhält 60 ccm der 31 % igen Dextroselösung in die r. Vena femoral. Vor- und nachher Epirenan ins r. Auge. Bis zu 28 Minuten nach der Infusion keine Wirkung auf die Pupille. (Es besteht Conjunctivitis auf beiden Augen.) Erst 33 Minuten nach der Infusion ist die r. Pupille weiter als die linke, und bleibt es in gleicher Weise 15 Minuten lang. Jedoch schwindet die Differenz bei starker Belichtung und beim Fixieren naher Gegenstände.

b) Infusion von Kochsalzlösungen.

Versuch 10.

25. V. 14. Hund Wolf. Infusion von 50 ccm einer der Dextroselösung isosmotischen NaCl-Lösung (10 % ig) in die r. Vena jugular. extern. Gleich danach Epirenaneinträufelung ins l. Auge. — 40 Minuten lang keine Wirkung. Danach abermals Infusion von 50 ccm 10 % iger NaCl-Lösung in die r. Vena jugular. mit neuer Epirenaninstillation. — 30 Minuten lang keine Wirkung. 70 Minuten nach der zweiten Infusion ist die l. Pupille wenig, aber deutlich weiter als die rechte.

Versuch 11.

5. VI. 14. Hund Wolf erhält in die l. Vena femoral. 60 ccm 10 % ige NaCl-Lösung. Danach Epirenan ins l. Auge. 70 Minuten lang keine Wirkung. Nunmehr Einguß von 100 g Dextrose in 200 g Wasser per Sonde mit neuer Epirenaninstillation. 36 Minuten danach ist l. Pupille wenig, aber deutlich weiter als rechte. (Nach 2 Stunden Erbrechen großer Flüssigkeitsmengen.)

Versuch 12.

5. VI. 14. Hund Fritz erhält in die l. Vena femoral. 60 ccm der 10 % igen NaCl-Lösung. Epirenan ins l. Auge. Bis zu 40 Minuten keine Wirkung auf die Pupille. Dann werden 100 g Dextrose in 200 g Wasser gelöst in den Magen gegossen. Neue Epirenaninstallation ins l. Auge. Nach 16 Minuten ist l. Pupille weiter als rechte, l. Iris reagiert träge. — Nach 12 weiteren Minuten ist Pupillendifferenz sehr deutlich.

Versuch 13.

12. VI. 14. Hund Fritz erhält in die r. Vena femoral. 150 ccm 10 %ige Kochsalzlösung. Vorher und nachher Epirenan ins r. Auge. Nach 10 Minuten r. Pupille etwas weiter als linke, Reaktion träge. Nach weiteren 9 Minuten Erweiterung der r. Pupille deutlich. Nach noch weiteren 11 und 23 Minuten Erweiterung beträchtlich.

Versuch 14.

17. VI. 14. Hund Paul erhält in die r. Vena femoral. 150 ccm 10 %ige Kochsalzlösung. Vor- und nachher Epirenan ins r. Auge. 22 Minuten danach r. Pupille weiter als linke. 13 Minuten vor Eintritt der Pupillenerweiterung werden aus der r. Art. femoral. 45 ccm Blut entleert und nach Rona-Michaelis enteiweißt. Das Blut enthält 0,099 % Dextrose (polarimetrisch festgestellt).

Versuch 15.

19. VI. 14. Hund Wolf erhält in die l. Vena jugular. intern. 150 ccm 10 %ige Kochsalzlösung. Vorher und nachher Epirenan ins l. Auge. 5 Minuten nach Beendigung des Einlaufs ist die l. Pupille weiter als die r., ebenso noch 30 Minuten danach, sowohl bei starker wie schwacher Beleuchtung. Nach eingetretener Pupillenerweiterung werden aus l. Carotis 48 ccm Blut entnommen. Dies enthält 0,13 % Dextrose.

Versuch 16.

23. VI. 14. Hund Fritz erhält 150 ccm 10 %ige NaCl-Lösung in die l. Vena jugular. intern. Epirenan vor- und nachher ins l. Auge. 10, 20 und 30 Minuten nach Einlauf l. Pupille deutlich größer als r. Nach Beginn der Erweiterung werden 46 ccm Blut aus l. Carotis entnommen. Das Blut enthält 0,216 % Dextrose.

Versuch 17.

26. VI. 14. Hund Paul. Infusion von 150 ccm 10 %iger NaCl-Lösung in die l. Vena femoral. Epirenan vor- und nachher ins r. Auge. Bereits 5 Minuten nach Beendigung der Infusion ist die Pupille erweitert und ist es noch nach 30 Minuten. Drei Minuten nach der Pupillenerweiterung werden 44 ccm Blut aus der l. Art. femoral. entnommen. Das Blut enthält 0,16 % Dextrose.

Versuch 18.

10. VII. 14. Hund Männe erhält 150 ccm 10 %ige NaCl-Lösung in die l. Vena femoral. Vor- und nachher Epirenan ins l. Auge. 29 Minuten nach der Infusion ist die l. Pupille weiter als die r. Nunmehr Entnahme von 44 ccm Blut aus der l. Art. femoral. Dextrosegehalt des Blutes 0,154 %.

Eingießungen von Dextroselösungen per os.

Versuch 19.

27. V. 14. Hund Wolf erhält nach 24stündigem Fasten mittels Schlundsonde 100 g Dextrose, in 200 g Wasser gelöst, in den Magen gegossen. Nach 5 Minuten Epirenaninstillation ins r. Auge. Bis 18 Minuten danach keine Wirkung. Dann zweite Instillation. Erbrechen der Zuckerlösung. Keine Pupillendifferenz.

Versuch 20.

27. V. 14. Hund Fritz ($10^3/_4$ kg) erhält per Sonde 100 g Dextrose in 200 g Wasser. Nach 3 Minuten Epirenan ins l. Auge. 13 Minuten lang keine Wirkung; ebensowenig nach einer zweiten Instillation bis zu 38 Minuten nach der Eingießung.

Versuch 21.

30. V. 14. Hund Fritz erhält per Sonde 100 g Dextrose in 200 g Wasser. Vor- und nachher Epirenan ins l. Auge. 7 Minuten nach der Eingießung l. Pupille sehr viel weiter als r. Reaktion der l. Iris auf Lichteinfall sehr träge. 30 Minuten nach der Infusion Pupillendifferenz noch sehr deutlich.

Versuch 22.

2. VI. 14. Hund Wolf erhält 100 g Dextrose in 200 g Wasser per Sonde. Vor- und nachher Epirenaninstillation. Die Zuckerlösung wird sofort erbrochen. 30 Minuten lang keine Pupillendifferenz.

Versuch 23.

2. VI. 14. Hund Fritz erhält 100 g Dextrose in 200 g Wasser per Sonde. 40 Minuten und 27 Minuten vor dem Einguß je eine Epirenaninstillation ins r. Auge ohne Wirkung auf die Pupille. Nach dem Einguß dritte Instillation — 20 Minuten nach dem Einguß r. Pupille weiter als linke; 10 Minuten danach Differenz noch stärker.

Versuch 24.

8. VI. 14. Hund Paul (10,75 kg) erhält 125 g Dextrose in 200 g Wasser in den Magen. Epirenan ins r. Auge. 18 Minuten nach Einguß r. Pupille deutlich weiter als l.; nach weiteren 5 Minuten ebenso. Rechte Iris reagiert träge, und Pupille bleibt bei Lichteinfall weiter als die l.

Versuch 25.

15. VI. 14. Hund Paul. Einguß von 125 g Dextrose in 200 g Wasser. Vorher und nachher Epirenan ins l. Auge. Nach 18 Minuten erbricht der Hund, doch ist die l. Pupille bereits weiter als r.

Versuch 26.

25. VI. 14. Hund Männe (6,3 kg) erhält 100 g Dextrose in 200 g Wasser per Sonde in den Magen. Epirenan vor- und nachher ins l. Auge. 14 Minuten nach Einguß l. Pupille größer als r. 41 Minuten nach Einguß keine Differenz mehr; nach weiteren 7 Minuten Erbrechen.

Versuch 27.

27. VI. 14. Hund Männe erhält 100 g Dextrose in 200 g Wasser in den Magen. Vor- und nachher Epirenan ins l. Auge. Bis zu 1 Stunde keine Wirkung auf die Pupille.

Versuch 28.

3. VII. 14. Hund Männe (nüchtern) erhält 125 g Dextrose in 200 g Wasser in den Magen. Vorher und 14 Minuten nachher Epirenan ins r. Auge. Keine Wirkung bis 46 Minuten nach dem Eınguß. Nach weiteren $7^1/_2$ Minuten zweimaliges Erbrechen großer Flüssigkeitsmengen. Während des Verlaufes einer weiteren Stunde keine Differenz der Pupillen.

Versuche mit Injektion von Extrakten diabetogener Drüsen.

Versuch 29.

1. VII. 14. Hund Wolf erhält 6,6 ccm 20%iges Thyreoglandol[1]) gleich 1,32 g frischer Drüsensubstanz und dazu an anderer Stelle 0,2 g Morphin injiziert. Zwei Epirenaninstillationen ins l. Auge in einem Zeitintervall von 26 Minuten. Bis zu 75 Minuten nach der Injektion keine Wirkung. Danach dritte Instillation. Nach weiteren 34 Minuten ist die l. Pupille weiter als die r.; nach weiteren 8 Minuten ist sie doppelt so weit und verhält sich auch so nach noch weiteren 28 Minuten.

Versuch 30.

1. VII. 14. Hund Fritz erhält 6,6 ccm 10%iges Pituglandol gleich 0,66 g frischer Drüsensubstanz, dazu an anderer Stelle 0,2 g Morphin injiziert. Zwei Epirenaninstillationen 5 und 23 Minuten nach der Injektion. 62 Minuten nach der Injektion noch keine Wirkung auf die Pupille; hierauf dritte Instillation. Nach weiteren 16 Minuten ist die l. Pupille größer als die r. Nach abermals 19 Minuten übertrifft sie die r. um das Doppelte und nach weiteren 23 Minuten um das ca. Dreifache bei heller Beleuchtung.

Versuch 31.

13. VII. 14. Hund Fritz erhält subcutan 10 ccm 20%iges Thyreoglandol gleich 2 g frischer Drüsensubstanz. Gleich danach und 42 Minuten später Epirenan ins r. Auge. Wirkung auf die Pupille nicht wahrnehmbar bis zu 2 Stunden. Das nun aus der r. Femoral. entnommene Blut (46 ccm) enthielt 0,113% Dextrose.

Versuch 32.

16. VII. 14. Hund Paul erhält 13 ccm 20%iges Thyreoglandol gleich 2,6 g frischer Drüsensubstanz subcutan injiziert. Nach $3^1/_2$ Stunden Epirenan ins l. Auge; ebenso nach weiteren 15 und abermals 35 Minuten.

---

[1]) Die benutzten Glandole wurden uns von der Firma Hoffmann La Roche & Co. in Basel und Grenzach in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt.

$4^3/_4$ Stunden nach der Injektion erscheint l. Pupille erweitert und ist es auch während der Blutentnahme, die $5^1/_4$ Stunde nach der Injektion erfolgt. Das aus der r. Femoral. entnommene Blut (49 ccm) enthielt 0,143 % Dextrose. — 6 Stunden nach der Injektion Dilatation sehr deutlich.

Wir fügen hier noch einige Versuche älteren Datums an:

Versuch 33.

10. VII. 12. Einem kleinen Hunde werden früh 8 Uhr subcutan 5 ccm Epirenan injiziert. Um 11 Uhr abermals 5 ccm Epirenan subcutan und Instillation einige Tropfen ins r. Auge. Um 1 Uhr r. Pupille dilatiert.

Versuch 34.

10. VII. 12. Einem zweiten Hunde werden um 8 Uhr früh 5 ccm Epirenan subcutan injiziert. Um 11 Uhr noch 3 ccm und Instillation ins r. Auge. Um 1 Uhr r. Pupille dilatiert.

Versuch 35.

19. VII. 12. Derselbe Hund erhält um 7 Uhr früh 10 ccm Epirenan subcutan. Um $10^1/_4$ Uhr Instillation von Epirenan ins r. Auge. Nach 1 Stunde starke Pupillenerweiterung. Am 20. VII. führt erneute Instillation von Epirenan ins r. Auge noch zu Pupillendilatation. Harn an diesem Tage schon ohne Zucker. Am 22. VII. wirkt Epirenan nicht mehr aufs Auge.

Versuch 36.

16. VII. 12. Hund erhält 1 ccm Pituitrin gleich 0,2 g frischer Substanz um $7^1/_2$ Uhr früh. Ebenso nochmals um $10^1/_2$ Uhr. Epirenaninstillation in ein Auge ohne Erfolg. — Am 17. VII. wiederum zweimal je 1 ccm Pituitrin um $7^1/_2$ und $10^1/_2$ Uhr. Nach der zweiten Injektion Epirenaninstillation mit positivem Erfolg nach 1 Stunde. — Am 18. VII wiederum zweimal je 1 ccm Pituitrin mit folgender Epirenaninstillation ins r. Auge. $^1/_2$ Stunde danach deutliche Pupillenerweiterung r.

Versuch 37.

31. VII. 12. Hund erhält früh $8^1/_2$ Uhr 4 ccm Pituglandol gleich 1,6 g frischer Drüsensubstanz. Epirenan nach $2^1/_2$ Stunden mit für 1 Stunde negativem Erfolge. Am I. VIII. 7 Uhr früh wieder 4 ccm Pituglandol. Um $11^1/_4$ Uhr Epirenan ins Auge mit positivem Erfolg. Am 2. VIII. Wiederholung des Versuches mit gleichem positiven Erfolg.

Versuch 38.

21. X. 12. Kleine Hündin erhält um $7^1/_2$ Uhr früh 6,6 ccm 20 %iges Thyreoglandol gleich 1,32 g frischer Substanz. Um $9^3/_4$ Uhr und um 11 Uhr Epirenan ins r. Auge, ebenso um $11^1/_2$ und $12^1/_2$ Uhr. Um $12^3/_4$ Uhr deutliche Dilatation der r. Pupille.

Phlorizin-Versuche.

Versuch 39.

1. VII. 14. Hund Männe erhält 0,6 g Phlorizin subcutan in 10 ccm 0,5%iger Sodalösung. Danach Epirenan ins l. Auge. Bis zu 1 Stunde und 38 Minuten keine Wirkung auf die Pupille. Im Harn reichlich Zucker.

Versuch 40.

3. VII. 14. Hund Paul erhält Epirenan ins r. Auge. Danach 1,0 g Phlorizin in 30 ccm 0,5%iger Sodalösung. 15 Minuten danach zweite Instillation. Keine Pupillendifferenz beobachtet.

Aus den vorstehenden Versuchen ergibt sich, daß Hyperglykämie, die herbeigeführt ist sei es durch Überschwemmung des Körpers mit Dextrose- oder konzentrierten NaCl-Lösungen, sei es durch Injektion von Extrakten diabetogener Drüsen mit oder ohne Morphin, sei es durch Brenztraubensäure oder Pankreasexstirpation, bei sonst normalen Tieren mit einem positiven Ausfall des Loewischen Phänomens einhergeht. Das steht scheinbar in Widerspruch mit einer Angabe von O. Loewi[1]), wonach der Zuckerreichtum der Gewebe es nicht ist, durch den die Augenreaktion ausgelöst wird. Loewi kam zu dieser Schlußfolgerung auf Grund der Tatsache, daß ein längere Zeit nach partieller Pankreasexstirpation diabetisch gewordener Hund während der ganzen Dauer dieses Versuches keine Mydriasis nach Adrenalineinträufelung zeigte. Aus der Mitteilung Loewis muß man schließen, daß er täglich das Augenphänomen prüfte, also täglich Adrenalin einträufelte. Dabei dürfte das zustande gekommen sein, was wir oben bereits erwähnt haben, nämlich eine allmählich eingetretene Unempfindlichkeit der Augen gegenüber dem Adrenalin.

Wenn schon auf Grund des vorstehenden Materials nicht anzunehmen ist, daß der positive Ausfall des Pupillenphänomens in unseren Versuchen auf eine Beeinträchtigung der pankreatischen Funktion zurückzuführen sei — man müßte denn auf dem Standpunkt stehen, daß jede Hyperglykämie zu einer Schädigung der endokrinen pankreatischen Funktion führt, ein Standpunkt, für den eine genügende experimentelle Grundlage nicht vorliegt — so wird die Unabhängigkeit des Phänomens vom Pankreas durch den folgenden Versuch direkt erwiesen.

[1]) O. Loewi, l. c. S. 90 Anmerkung.

Versuch 41.

Dem Hunde Wolf wird am 22. VII. das Pankreas total exstirpiert. Am 23. tritt vormittags auf Epirenaninstillation ins r. Auge innerhalb weniger Minuten eine sehr erhebliche Pupillenerweiterung ein. Nunmehr erhält der Hund im Laufe der nächsten 7 Stunden dreimal je 0,5 g Phlorizin in soda-alkalischer Lösung subcutan injiziert. Dreiviertel Stunden nach der letzten Injektion erfolgt auf eine neue Epirenaninstillation ins r. Auge keine deutliche Pupillenerweiterung innerhalb 25 Minuten. Das jetzt entnommene Blut enthielt 0,07 % Dextrose.

In diesem Falle haben wir bei einem des Pankreas beraubten Tiere positive Reaktion zur Zeit der Hyperglykämie. Nachdem durch Plorhizin die Hyperglykämie in Hypoglykämie verwandelt war, trat keine Pupillenerweiterung mehr ein. —

Nach dem Ausfall der hier mitgeteilten Versuche kann die s. Z. von O. Loewi gezogene Schlußfolgerung heute nicht mehr aufrecht erhalten werden; nämlich der Schluß, daß der positive Ausfall der Adrenalinreaktion charakteristisch ist für das Bestehen einer Pankreasaffektion, und daß er bei Diabetikern die pankreatogene Entstehung der Krankheit anzeigt.

Wir selber müssen das Pupillenphänomen als eine Folge der Hyperglykämie betrachten, sei es nun, daß der erhöhte Zuckergehalt des Blutes sympathische Förderungsfasern reizt oder sympathische Hemmungsfasern lähmt. Was von beiden Modalitäten zutrifft, hoffen wir durch eine spätere Untersuchung klarstellen zu können.

Nach unserer Auffassung müßte das Loewische Phänomen zur Konstatierung einer einen gewissen Grad erreichenden Hyperglykämie dienen können und dadurch bei Beachtung geeigneter Kautelen die Differenzierung zwischen Diabetes sensu strictiori und Glycosurie renalen Ursprungs ermöglichen. Daß in letzterem Falle trotz der bestehenden Glycosurie das Pupillenphänomen nicht zustande kommt, beweisen die beiden oben an letzter Stelle mitgeteilten Phlorizin-Versuche.

Über die Einwirkung von alkoholischen Säuren auf Eiweißstoffe.

Von

J. Herzig und K. Landsteiner.

(Eingegangen am 22. Juli 1914.)

Die Ergebnisse unserer Untersuchung[1]) über mit Diazomethan methyliertes Eiweiß legten es nahe, den Nachweis eines Eintrittes von Alkylgruppen auch bei jenen Produkten zu versuchen, die bei der Einwirkung von alkoholischen Säuren auf Proteine entstehen. Diese Reaktion führte zuerst Suida[2]) an Schafwolle und Seide bei Untersuchungen über die Färbung animalischer Fasern aus und zog das Stattfinden von Alkylierungen oder Anhydrisierungen in Erwägung. Landsteiner[3]) behandelte in derselben Weise Casein, Blutkörperchenstromata und Serumeiweiß unter gleichzeitiger serologischer Prüfung der entstandenen Substanzen. Da durch dieses Verfahren die Proteine serologisch ungleich stärker verändert wurden als bei der Behandlung mit gleich konzentrierten wässerigen Säuren, konnte eine beträchtliche chemische Veränderung vermutet werden, zumal bei der Einwirkung von Diazomethan eine Beziehung zwischen der serologischen und chemischen Veränderung sich ergeben hatte.

Über die Einwirkung von alkoholischer Salzsäure auf Eiweiß liegen noch Angaben von Br. O. Přibram[4]) sowie von Abderhalden und Hanslian[5]) vor, doch ist der Gegenstand

---

[1]) Diese Zeitschr. **61**, 458, 1914.

[2]) Monatsh. f. Chem. **25**, 1107, 1904; **26**, 413 u. 855, 1905; **27**, 225 u. 1193, 1906.

[3]) Centralbl. f. Bakt. **41**, 108; diese Zeitschr. **58**, 362. — Landsteiner und Prášek, Zeitschr. f. Immunitätsf. **17**, 363, 1913; **20**, 211, 1913.

[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. **71**, 472, 1911. — Vgl. auch Schrötter, Monatsh. f. Chem. **16**, 609, 1895.

[5]) Ebenda **77**, 285, 1912.

dieser Arbeiten hauptsächlich die Hydrolyse unter gleichzeitiger Esterifizierung.

Wir haben in der Absicht, die Hydrolyse möglichst zu vermeiden, die Versuche so ausgeführt, wie sie von Landsteiner und Prášek[1]) mitgeteilt wurden.

In bezug auf die Bestimmung von OCH_3 und NCH_3 ist an das zu erinnern, was wir schon[2]) erwähnt haben. Die Werte können demnach nach der bisherigen Auffassung höchstens zu klein sein. Im übrigen werden sich möglicherweise in Zukunft, wenn wir den Äthyl- durch Methylalkohol ersetzen werden, nach der Modifikation von Kirpal[3]) exaktere Werte erhalten lassen.

Um den Vergleich der beiden Versuchsreihen — Einwirkung von Diazomethan und alkoholischen Säuren — zu erleichtern, wollen wir neben den Werten für OC_2H_5 auch die auf OCH_3 umgerechneten Werte in $^0/_0$ angeben.

I. Serumeiweiß vom Pferd, Äthylalkohol und Salzsäure.

1.	Bei gewöhnl. Temp. gesätt., 24^h stehen gel. . .	$4{,}07\ OC_2H_5 = 2{,}81\ OCH_3$
		$4{,}29\ OC_2H_5 = 2{,}96\ OCH_3$
2.	„ ca. 62°, 48^h 1,8 $^0/_0$ige Salzsäure	$6{,}47\ OC_2H_5 = 4{,}46\ OCH_3$
3.	„ „ 62°, 48^h 0,9 $^0/_0$ige „	$5{,}54\ OC_2H_5 = 3{,}82\ OCH_3$
4.	„ „ 62°, 48^h 0,36 $^0/_0$ige „	$5{,}24\ OC_2H_5 = 3{,}64\ OCH_3$

II. Serumeiweiß vom Pferd, Äthylalkohol und Schwefelsäure.

1.	Bei 37°, 48^h 1 $^0/_0$ige Schwefelsäure	$5{,}15\ OC_2H_5 = 3{,}55\ OCH_3$
2.	„ 62°, 48^h 1 $^0/_0$ige „	$6{,}15\ OC_2H_5 = 4{,}24\ OCH_3$
3.	„ 62°, 48^h 0,4 $^0/_0$ige „	$5{,}90\ OC_2H_5 = 4{,}07\ OCH_3$
4.	„ 62°, 48^h 0,2 $^0/_0$ige „	$5{,}03\ OC_2H_5 = 3{,}47\ OCH_3$
5.	„ 62°, 48^h 0,1 $^0/_0$ige „	$3{,}22\ OC_2H_5 = 2{,}22\ OCH_3$

Außerdem ist noch ein Versuch zu erwähnen, bei dem Eiweiß mit Alkohol allein durch 48 Stunden bei ca. 62° behandelt wurde. Er ergab $0{,}31\ OC_2H_5 = 0{,}26\ OCH_3$, so daß der Schluß berechtigt erscheint, daß tatsächlich die Anwesenheit von Säure, wenn auch in geringer Menge, für die Reaktion notwendig ist.

---

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsf. 20, 211.

[2]) Diese Zeitschr., l. c. Wir haben seither eine blinde Methoxylbestimmung mit einer 10 $^0/_0$igen Jodcadmiumlösung als Waschflüssigkeit gemacht. Das Resultat war ein rein negatives, es geht also auch unter diesen Umständen keine Jodwasserstoffsäure über.

[3]) Berl. Ber. 47, 1084, 1914.

Was das Alkyl am Stickstoff anlangt, so haben wir nach der Behandlung mit Alkohol und Salzsäure kaum mehr erhalten, als das Serumeiweiß an sich schon lieferte. Wir fanden jetzt 1,2 bis 1,9 CH_3 an N gebunden, während der früher[1]) für nichtbehandelte Eiweißkörper gefundene Wert 1,07 bis 1,78 CH_3, an N gebunden, betrug.

Daß bei der Behandlung mit alkoholischen Säuren Alkyl überhaupt aufgenommen wird, ist als zweifellos zu betrachten. Es sind nur verschiedene Möglichkeiten der Art der Bindung in Erwägung zu ziehen, und außerdem entsteht noch die Frage, inwieweit die Alkylderivate von noch unzersetztem Eiweiß abstammen.

Ohne diese Fragen vollkommen erledigen zu wollen, ist in bezug auf die Art der Alkylierung folgendes zu bemerken. Da eine Vermehrung des Gehaltes an Salzsäure bzw. Schwefelsäure bei dem behandelten Eiweiß zu konstatieren ist, könnte man an eine Addition von Chloralkylen oder Alkylschwefelsäuren denken. Die Addition von Chloralkylen könnte normalerweise nur den Alkylgehalt am Stickstoff vermehren, und nicht den am Sauerstoff. Tatsächlich findet aber das Umgekehrte statt. Gegen die Möglichkeit, daß die nachgewiesenen Alkylgruppen nur von der Addition von Alkylschwefelsäure herrühren, ist aber vorläufig die nachstehende Beobachtung anzuführen.

Läßt man auf das mit alkoholischen Säuren behandelte Serumeiweiß Diazomethan einwirken, so erscheinen die Werte für OCH_3 nur wenig verändert, während die Werte für an N gebundenes CH_3 auf die normale Höhe des mit Diazomethan allein behandelten Serumeiweißes ansteigen. Es ist daraus zu schließen, daß ein Teil der sonst mit Diazomethan reagierenden Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppen durch die vorausgehende Behandlung mit alkoholischen Säuren schon alkyliert wurde.

Bei den folgenden analytischen Daten ist zur besseren Übersicht das ganze Jodsilber auf OCH_3 bzw. CH_3 gerechnet worden.

I. Serumeiweiß vom Pferd, mit gesättigter alkoholischer Salzsäure 24^h behandelt.

a) Vor der Behandlung mit Diazomethan . . . 3,06 OCH_3
b) Nach „ „ „ „ . . . 3,91 OCH_3
5,11 CH_3 an N gebunden.

[1]) Diese Zeitschr., l. c.

II. Serumeiweiß vom Pferd, mit 0,4%iger alkoholischer Schwefelsäure bei 62° 48h behandelt.

a) Vor der Behandlung mit Diazomethan . . . 4,07 OCH_3
b) Nach " " " " . . . 4,88 OCH_3
4,66 CH_3 an N gebunden.

III. Serumeiweiß, mit 1%iger alkoholischer Schwefelsäure bei 62° 48h behandelt.

a) Vor der Behandlung mit Diazomethan . . . 3,55 OCH_3
b) Nach " " " " . . . 4,49 OCH_3
4,46 CH_3 an N gebunden.

Mit Rücksicht auf diese Ergebnisse halten wir es vorläufig für sehr wahrscheinlich, daß die Alkylgruppe an den Sauerstoff tritt, und zwar kommt dabei hauptsächlich die Carboxylgruppe in Betracht, weil, wie es schon Landsteiner[1]) erwähnt, die mit alkoholischen Säuren behandelten Präparate die Millonsche Reaktion noch liefern.

Schwieriger gestaltet sich die Beantwortung der zweiten Frage. Immerhin ist aber die Einwirkung der alkoholischen Säuren nach dem benutzten Verfahren eine anscheinend sehr gelinde, die vom Eiweiß abfiltrierte Flüssigkeit ist nicht oder sehr wenig gefärbt, das Eiweiß selbst bleibt weiß, und außerdem zeigten sich bei den daraufhin geprüften Darstellungen sehr geringe Gewichtsverluste, bisweilen sogar eine kleine Gewichtszunahme des Eiweißes. Es ist also die Annahme nicht unberechtigt, daß bei der Reaktion nur eine geringe Hydrolyse stattfindet.

Die abgehandelten Versuche und Bestimmungen sind mit den Herren Zipperer und Schuster ausgeführt worden.

---

[1]) Diese Zeitschr., l. c.

Versuche über einseitige Ernährung.

II. Mitteilung.

Wasserverteilung und Ödembildung bei Salzzufuhr.

Von

Paul Tachau.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 23. Juli 1914.)

Wie in der 1. Mitteilung[1]) gezeigt wurde, führt eine vorsichtige Zufuhr indifferenter Salze bei der Maus zu Ödembildung. Die Analogie mit gewissen Zuständen beim menschlichen Säugling ließen es wünschenswert erscheinen, experimentell genauer zu verfolgen, ob dabei erhebliche Änderungen im Wasser- und Salzbestande des Organismus eine Rolle spielen. Besonders die Leichtigkeit, mit der beschriebenen Anordnung größere Versuchsreihen aufzustellen und damit eine breitere Grundlage für die Beurteilung der Resultate zu gewinnen als bisher möglich war, schien diese Bemühungen aussichtsreich zu machen.

Die Zahl der bisher vorliegenden Untersuchungen über den Einfluß einer ungeeigneten Ernährung auf die Zusammensetzung des Körpers ist wegen der Schwierigkeiten in der Beschaffung geeigneter Versuchs- und Vergleichsobjekte sehr spärlich. Bei der Verwendung größerer Tiere ist die Zahl der Parallelversuche schon dadurch sehr beschränkt, daß man nur bei Individuen des gleichen Wurfes auf einigermaßen vergleichbare Zahlen hoffen darf. Dazu kommt, daß die komplizierte Zusammensetzung der Nahrung die Entscheidung der Frage erschwert, welche spezielle Nahrungskomponente für die Wirkung verantwortlich zu machen ist. Dies gilt z. B. für die

[1]) Diese Zeitschr. **65**, 253, 1914.

wertvollen Experimente von Orgler[1]), Eckert[2]) und Lederer[3]), nach denen junge mit Kuhmilch genährte Hunde etwas mehr Wasser enthielten als die gesäugten resp. nach Abschluß der Säugeperiode gemischt ernährten Geschwister. Demgegenüber scheinen die Weigertschen Versuche[4]) ziemlich einwandfrei zu erweisen, daß eine Kohlenhydratüberfütterung junger Hunde mit Wasserspeicherung einhergeht.

Weit weniger Sicherheit bieten, wie das in der Natur der Sache liegt, die an Säuglingen[5]) ausgeführten Untersuchungen. War schon im Tierversuch die Auswahl der Vergleichsobjekte schwierig, so ist es hier ganz unmöglich, zuverlässige Kontrollen und eine zu exakten Schlußfolgerungen ausreichende Statistik zu beschaffen.

Meine Untersuchungen sind an dem in der vorigen Mitteilung veröffentlichten Material ausgeführt, sie beziehen sich auf den Wasser- und Chlorgehalt von einseitig ernährten Mäusen. Die Tiere wurden in Chloroformnarkose getötet. Um durch den verschieden großen Darminhalt nicht unberechenbare Fehler in Kauf zu nehmen, wurde der Intestinaltrakt vom Magen abwärts nicht mit verarbeitet. Zwar ließ sich dabei wiederum eine Ungenauigkeit nicht vermeiden, nämlich der Verlust von wechselnden Mengen der in der Darmwand und außen am Darme haftenden Flüssigkeit. Durch eine größere Zahl von Untersuchungen durfte man indessen hoffen, die so gegebene Unsicherheit gänzlich auszuschalten. — Nach Herausnahme des Darmes wurden die Tiere mit der Schere gut zerkleinert und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz (auf Zentigramm) getrocknet.

Zur Fettbestimmung wurde die früher allgemein übliche Ätherextraktion nach vorausgegangener kurzer Alkoholextraktion benutzt. Sie wurde der Bestimmung der Fettsäuren nach Kumagawa-Suto hauptsächlich deshalb vorgezogen, weil die

[1]) A. Orgler, diese Zeitschr. 28, 359, 1911.

[2]) H. Eckert, Ursachen und Wesen angeborener Diathesen, Berlin 1913.

[3]) R. Lederer, Zeitschr. f. Kinderheilk. 10, 365, 1914.

[4]) R. Weigert, Jahrb. f. Kinderheilk. 61, 256, 1905,

[5]) F. Steinitz, Jahrb. f. Kinderheilk. 59, 447, 1904. — Steinitz und Weigert, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 206, 1905. — Frank und Stolte, Jahrb. f. Kinderheilk. 78, 167, 1913.

extrahierte Substanz weiter verarbeitet werden sollte. Die Natur des Ätherextraktes wurde nicht weiter untersucht. Daß er außer genuinem Fett ziemlich viel Lipoide enthalten mußte, ist selbstverständlich, schon in Hinblick darauf, daß Gehirn und Rückenmark mit extrahiert wurden. Andererseits blieben bei der Extraktion kleine Mengen (0,05 bis 0,1 g) ätherlöslicher Stoffe im Rückstande, die durch Verseifung desselben noch gewonnen werden konnten. In den vorliegenden Versuchen konnte dieser Fehler vernachlässigt werden. Die Fettbestimmung verfolgte nämlich wesentlich den Zweck, festzustellen, inwieweit die Fettdepots gefüllt resp. erschöpft waren und so die Möglichkeit für eine Berechnung zu schaffen, wie sich die Wasserverteilung in der fettfreien Körpersubstanz gestaltet hat. Der Einwand, den Rubner[1]) zuerst älteren Untersuchungen gegenüber geltend machte, daß der verschiedene Fettreichtum zweier Tiere eine Verschiebung der in Betracht kommenden Komponenten vortäuschen könnte, ohne daß sie in Wirklichkeit besteht, dürfte allgemein anerkannt sein. Das trifft aber nur den Gehalt an Fett im Fettgewebe, das nur wenig Wasser enthält, nicht aber den Gehalt an molekularem, in den Gewebselementen verteilten Fett, das übrigens zum großen Teil gar nicht aus echtem Fett besteht. Da nun das Fettgewebe bei dem angewandten Verfahren sein Fett bei der Extraktion leicht abgibt, halte ich für unseren Zweck die ohne Verseifung gefundenen Zahlen für die zutreffenderen. Übrigens veranlaßt das bei der Verseifung erhaltene Plus bei der prozentischen Berechnung des Wassergehaltes nach meinen Kontrollversuchen nur eine Erhöhung in der ersten Dezimale (z. B. in Versuch 93: 74,8 statt 74,4%), was hier um so weniger ins Gewicht fällt, als es sich vor allem um die Gewinnung von vergleichbaren Werten handelt.

Nach der Extraktion wurde in einem Teil der Versuche der gesamte Rückstand nach dem Verfahren von Stolte[2]) verascht und in dem mit Salpetersäure versetzten Aschenauszuge die Chlortitration nach Volhard ausgeführt. Wegen der minimalen Chlormengen verwandte ich $^{n}/_{20}$-Lösungen, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß dabei der Farbenumschlag vollkommen scharf war.

[1]) Rubner, v. Leidens Handbuch der Ernährungstherapie 1, 50, 1898.

[2]) K. Stolte, diese Zeitschr. 35, 104, 1911.

Tabelle I gibt zunächst eine Übersicht über die an **Normal-, Karenz-, Fett- und Zuckertieren** ausgeführten Analysen.

Tabelle I.

Wassergehalt der Normal-, Karenz-, Palmin- und Zuckertiere.

	Versuchs-nummer	Versuchs-dauer	Gewichts-änderung %	Endgewicht	Gewicht des Darmtrakts	Wassergehalt in % der fett-freien Körpersubstanz (ohne Darm)	Wassergehalt in % der fett-haltigen Körpersubstanz (ohne Darm)	Ätker-extrakt %
Normaltiere	78	—	—	20,76	3,25	**71,1**	66,8	6,1
	34	—	—	15,29	3,50	**72,5**	65,0	10,5
	93	—	—	16,49	2,35	**74,5**	67,1	11,2
	32	—	—	17,60	2,67	**74,5**	66,4	13,5
	92	—	—	15,86	2,58	**74,7**	69,7	6,7
	79	—	—	18,29	2,02	**74,9**	65,7	12,2
	91	—	—	15,02	2,05	**75,0**	63,5	15,2
	66	—	—	17,73	2,45	**75,4**	63,7	15,5
	90	—	—	17,48	2,57	**75,5**	68,0	9,9
	170	—	—	14,85	2,82	**75,4**	72,5	3,8
	67	—	—	15,83	2,68	**75,8**	64,6	14,9
	169	—	—	12,42	2,43	**77,9**	72,2	7,2
Karenztiere	42	14	−30	16,18	2,70	**72,4**	72,0	0,5
	118	9	−30	19,20	3,59	**72,4**	70,9	2,0
	39	14	−30	12,65	2,05	**73,4**	72,7	0,9
	98	9	−30	11,33	1,84	**74,1**	72,9	1,6
	99	9	−30	12,72	1,81	**74,4**	72,6	2,5
	119	9	−35	18,78	3,02	**74,4**	74,2	1,2
Palmintiere	20	7	−35	17,05	2,35	**70,5**	67,5	4,2
	116	13	−25	21,10	3,78	**73,2**	70,6	3,5
	115	13	−15	23,70	4,95	**74,6**	71,2	3,7
Zuckertiere	10	27	+ 7,5	18,41	4,45	**72,2**	68,7	5,1
	165	6	−10	14,52	3,47	**72,7**	69,0	4,9
	72	15	± 0	15,03	3,45	**73,8**	70,8	6,0
	103	6	± 0	15,24	3,15	**75,4**	69,6	7,7
	71	9	+ 3,5	17,62	3,00	**75,8**	71,6	5,5
	73	9	± 0	13,85	2,70	**76,2**	65,5	12,9
	173	6	± 0	15,97	4,12	**74,9**	65,4	12,7
	177	6	− 5	15,17	4,24	**72,0**	63,6	11,8
	178	6	+10	14,78	3,35	**76,6**	61,9	16,4

Die Zusammenstellung lehrt in Bezug auf die Wasserverteilung, daß der Wassergehalt nach Ausschluß des Darmes und seines Inhalts, bezogen auf die fettfreie Körpersubstanz, viel weniger schwankt als bei Berechnung auf fetthaltige Substanz, wie nach dem oben Gesagten zu erwarten war. Es ergibt sich im Mittel:

für 12 Normaltiere zu 74,8 % mit einer mittleren Abweichung[1]) von ± 0,49,

für 6 Karenztiere zu 73,5 % mit einer mittleren Abweichung von ± 0,38,

für 9 Zuckertiere zu 74,4 % mit einer mittleren Abweichung von ± 0,60,

Die Palmintiere schließen sich den Carenztieren an. Da mir nur 3 Analysen zur Verfügung stehen, führe ich keine Mittelzahlen an.

Tabelle II.

Wassergehalt der Salztiere.

	Versuchsnummer	Vers.-Dauer	Gewichtsänderung %	Endgewicht	Gewicht des Darmes	Wassergehalt in % der fettfreien Körpersubst. (ohne Darm)	Wassergehalt in % der fetthaltig. Körpersubst. (ohne Darm)	Ätherextrakt %	Ödeme	Bemerkungen
Kochsalztiere	111	39	−20	14,48	4,00	**72,6**	67,8	6,7	+	Gruppe I: Gleichmäßiger Gewichtsabfall.
	33	14	− 5	17,71	3,31	**72,7**	69,5	4,4	±	
										Gruppe II: Gewichtszunahme
	58	15	± 0	17,39	3,60	**73,0**	68,5	6,2	+	1 Tag v. d. Analyse 15 %,
	112	39	−20	14,83	4,60	**73,6**	71,9	4,9	+	2 Tage „ „ „ 10 %,
	104	18	± 0	16,02	3,53	**73,6**	71,6	2,8	++	3 „ „ „ „ 20 %,
	113	18	± 0	18,59	4,10	**74,2**	70,3	5,2	++	1 Tag „ „ „ 10 %,
	17	23	± 0	17,09	3,45	**74,2**	69,9	5,9	+	2 Tage „ „ „ 10 %.
	16	23	−10	12,59	2,67	**76,6**	71,8	6,1	+	Gruppe III: Zum Schluß Gewichtsstillstand.
	89	7	+ 5	16,30	3,30	**77,3**	69,6	9,9	+	
	87	18	± 0	16,85	4,17	**73,0**	69,2	5,3	+	Gruppe IV: Wie Gruppe III.
	108	10	± 0	20,27	3,20	**74,0**	65,7	10,0	+	
	56	14	−15	16,50	3,55	**74,7**	70,3	6,3	+	
	63	27	± 0	14,32	3,56	**75,3**	68,9	8,5	+	
	109	39	−20	12,55	3,50	**75,4**	71,9	4,5	+	
	64	24	+ 5	16,13	3,06	**75,4**	67,2	10,7	+	
Phosphattiere	123	28	−20	11,15	2,79	**72,0**	68,3	4,7	+	
	74	55	−10	17,45	4,03	**72,6**	66,3	8,5	0	
	75	55	± 0	16,65	4,33	**73,4**	66,5	9,5	+	
	124	3	− 5	15,78	2,26	**81,4**	79,6	1,9	+++	
Lactattiere	133	20	−15	12,14	2,93	**73,5**	68,0	5,0	0	
	134	20	− 5	17,28	4,24	**74,9**	69,4	7,1	+	

[1]) Die mittlere Abweichung (mittlerer Fehler) der einzelnen Beobachtung von dem Mittelwerte ist mit Hilfe der Fehlerquadrate nach der Gleichung:

$$E = \pm \sqrt{\frac{\Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \ldots + \Delta_n^2}{n(n-1)}}$$

berechnet, in der n die Zahl der Analysen, $\Delta_1, \Delta_2, \ldots \Delta_n$ die einzelnen Abweichungen vom arithmetischen Mittel bedeuten.

Tabelle II zeigt zunächst, daß der Inhalt des Darmes, wie bei den Zuckertieren, etwas vermehrt ist. Sein Gewicht beträgt 2,26 bis 4,60 g und ist im Mittel 22 % des Körpergewichtes.

Der mittlere Wassergehalt, auf fettfreie Körpersubstanz berechnet, ergibt sich:

für 15 Kochsalztiere zu 74,6 %, mit einer mittleren Abweichung von ± 0,36, und

für 6 Phosphat- und Lactattiere zu 74,6 %, mit einer mittleren Abweichung von ± 1,45.

Danach ist er von dem der Normaltiere nicht verschieden. Eine Ausnahme hiervon macht Versuch Nr. 124. Hier kam es tatsächlich zu einer starken Wasseranhäufung. Eine Parallele zu diesem Versuch bildet Nr. 8, wo sich bei einem Kochsalztier die hochgradige Hautwassersucht auch in der Gewichtskurve außerordentlich deutlich geltend machte (vgl. I. Mitteilung, Fig. 2).

Es fragte sich nun, ob nach der Zufuhr von so viel Salz die Körperflüssigkeiten einen höheren Salzgehalt aufwiesen. Auch das war nicht der Fall.

Tabelle III.
Chlorgehalt.

Kochsalztiere			Normaltiere		
Nr.	Gesamtchlor mg	Auf Körperwasser %	Nr.	Gesamtchlor mg	Auf Körperwasser %
87	12	**0,15**	169	12	**0,17**
113	16	**0,16**	79	21	**0,20**
104	18	**0,21**	92	19	**0,21**
112	16	**0,22**	90	22	**0,22**
56	22	**0,24**	91	21	**0,26**
63	18	**0,24**	66	27	**0,28**
33	25	**0,25**			
	Mittel	0,21		Mittel	0,22

Diese Resultate scheinen auf den ersten Blick mit den Anschauungen im Widerspruch zu stehen, die man sich in den letzten Jahren bezüglich der Abhängigkeit der Ödembildung von Wasser- und Salzretention gebildet hat. A priori sollte man erwarten, daß die Ödembildung mit einer Erhöhung des prozentischen Wasser- und Salzgehaltes des Gesamtorganismus

einhergeht, da die hydropischen Ergüsse ja erheblich weniger feste Bestandteile enthalten als der Durchschnitt des Tierkörpers. Das ist aber, wie aus obigen Analysen hervorgeht, bei den gewählten Versuchsbedingungen durchaus nicht der Fall — mit Ausnahme des Versuchs Nr. 124. Es ist nun leicht einzusehen, daß die Wasserretention in dem vor der Analyse ausgeschalteten Darm, die im Mittel 6% des Körpergewichts beträgt (Darmgewicht der Salztiere 22%, der Normaltiere 16%), auch nicht allein dazu ausreicht, die Gewichtsschwankungen und besonders die übermäßigen Gewichtszunahmen zu erklären, wie sie in der I. Mitteilung als charakteristisch für die Salztiere geschildert wurden[1]). Immerhin ist hier wie bei den Zuckertieren zuzugestehen, daß der Füllungszustand des Darmes einen gewissen Anteil an den Gewichtsschwankungen haben kann. Für die Beurteilung der hydropigenen Wirkung der Salzfütterungen kann aber von der Wasserretention im Darme vollständig abgesehen werden. Die Ausschaltung des Darmes bei den Analysen bedeutet vielmehr die Beseitigung eines wechselnden Faktors und erlaubt, die Folgerungen mit größerer Sicherheit auszusprechen, was um so wichtiger ist, als diese wie gesagt zu den meist gehegten Vorstellungen in Widerspruch zu stehen scheinen.

Bei dem Versuche, die gefundenen Tatsachen einer Theorie der Ödembildung einzufügen, müssen zunächst einige Angaben erwähnt werden, deren Deutung heute noch lebhaft diskutiert wird[2]), und die zeigen, daß die hier obwaltenden Beziehungen absolut keine einfachen sind. In der Regel geht die Entstehung der Ödeme Hand in Hand mit einer entsprechenden Wasser- und Salzretention. Es ist indessen bekannt, daß unter Umständen Salz ohne entsprechende Wassermengen aufgestapelt wird[3]) („Retention sèche"), während andererseits der Organismus überschüssig zugeführtes Salz trotz darauf

[1]) Vgl. dazu Fig. 2 der I. Mitteilung S. 260 und vorstehende Tab. II, 2. Gruppe.

[2]) L. F. Meyer, Ergebnisse d. inn. Med. u. Kinderheilk. **1**, 317, 1908; Derselbe, Jahrb. f. Kinderheilk. **71**, 1, 1910. — E. Schloß, ebenda **71**, 296, 1910; Derselbe, Zeitschr. f. Kinderheilk. **3**, 441, 1912. — P. F. Richter, Deutsche med. Wochenschr. **1910**, 1737.

[3]) N. Krasnogorski, Jahrb. f. Kinderheilk. **72**, 373, 1911. Versuch I, II u. III.

folgender Entwicklung von ausgesprochenem Ödem sofort restlos auszuscheiden vermag[1]). In unseren Versuchen sind nun die hydropischen Wasseransammlungen nicht einmal der Ausdruck eines erhöhten Wasserbestandes. Es liegt deshalb am nächsten und stößt bei Berücksichtigung der vorstehenden Angaben auf keine Schwierigkeiten im Verständnis, daß es sich nur um eine veränderte Wasserverteilung, um eine abnorme Lokalisation desselben handelt, die mit großer Wahrscheinlichkeit ihren Grund in einer Erhöhung des osmotischen Drucks in den zirkulierenden Körperflüssigkeiten hat. Nach Prof. Hofmeister könnte man sich die Entwicklung in folgender Weise denken:

1. Das überschüssig zugeführte Salz kommt im Darm zur Resorption und erhöht so die Salzkonzentration im Blute. Erfahrungsgemäß wird es sehr bald in den Capillaren an die Gewebsflüssigkeiten abgegeben, und falls die Niere nicht imstande ist, den Salzüberschuß zu beseitigen, steigt die Salzkonzentration und somit der osmotische Druck der Gewebslymphe. Dies führt zu einer Abgabe von Zellflüssigkeit aus den Gewebselementen (den Zellen der parenchymatösen Organe der Muskelfasern usw.), was eine entsprechende geringe Volumenverminderung, eine Schrumpfung derselben, zur Folge hat (1. Stadium).

2. Der erhöhte Salzgehalt der Gewebe führt zur vermehrten Wasseraufnahme seitens des Tieres. Wenn die Niere nicht imstande ist, dieses Plus an Wasser zu entfernen, so sammelt es sich an den Orten der geringsten Spannung — Unterhautzellgewebe, eventuell seröse Höhlen — als „Ödemflüssigkeit“ an. In diesem 2. Stadium ist die Gesamtwassermenge des Körpers erhöht, während die Salzkonzentration und der osmotische Druck sich wieder der Norm nähern. Es ist leicht einzusehen, daß bei intakter Nierensekretion dieses Stadium nicht lange bestehen kann und daß man es nur zufällig bei der Analyse antrifft. Hierher dürfte der hohe Wassergehalt in Versuch Nr. 124 zu rechnen sein.

3. Infolge der energischen Nierenarbeit sucht der Organismus sich stetig des Wasserüberschusses zu entledigen. Dies

---

[1]) N. Krasnogorski, l. c. Versuch IV–V.

kann aber nur in dem Maße geschehen, als die an den Orten des Ödems angehäufte Lymphe zur Resorption gelangt. Da aber der Abfluß der Lymphe nach der Blutbahn von der Gewebsspannung abhängt, so ist eine restitutio ad integrum nur zu erwarten, wenn die Gewebsspannung ihren ursprünglichen Tonus wieder erreicht. Dies geschieht aber nicht sofort. Die wiederholte, jeder Salzzufuhr folgende Lymphanhäufung führt zu einer Erschlaffung, einer verminderten Spannung des Unterhautzellgewebes. Der gleichzeitig eintretende Fettschwund wirkt in gleichem Sinne, und infolge der mangelnden vis a tergo erfolgt der Abfluß der Ödemflüssigkeit nur sehr träge. Andererseits dürften aber auch die Gewebselemente, die unter dem Einfluß der Salzzufuhr Wasser eingebüßt haben, nur allmählich ihren ursprünglichen Wassergehalt und damit ihr ursprüngliches Volumen wiedergewinnen. Es muß sich daher in diesem 3. Stadium zu einer Zeit, wo noch keine wirkliche Restitution erfolgt ist, der durchschnittliche Wasser- und Salzgehalt wieder der Norm nähern. Die Trägheit der Wasserabgabe aus den Orten des Ödems wird durch die Trägheit der Wasseraufnahme von seiten der Gewebselemente annähernd kompensiert.

Inwiefern diese Vorstellungen dem tatsächlichen Sachverhalt entsprechen, wird sich freilich erst beurteilen lassen, wenn die Geschwindigkeit, mit der sich im lebenden Organismus osmotische Störungen ausgleichen, genauer untersucht ist.

Zusammenfassung.

1. Der Körper der gesunden weißen Maus enthält nach Entfernung des Darmes rund 74,5 % Wasser. Einseitige Ernährung mit Zuckerüberschuß und auch andauernde Zufuhr von anorganischen Salzen (Kochsalz, Natriumphosphat, Natriumlactat) bewirken in der Regel keine Änderung dieses Verhältnisses, und zwar auch dann nicht, wenn die Zusätze, wie das bei den Salzen der Fall ist, zu dem Auftreten von Ödemen führen.

Unzureichende Darreichung einer sonst zweckmäßigen Nahrung veranlaßt nur geringe prozentische Abnahme des Wassergehaltes.

2. Der prozentische Chlorgehalt der Tiere wird durch vermehrte Zufuhr von Kochsalz nicht gesteigert. Ebensowenig

wird dadurch eine dauernde Erhöhung des osmotischen Druckes bewirkt.

3. Das Auftreten der Ödeme ist nicht auf Wasserretention zu beziehen. Vielmehr sprechen die beobachteten Tatsachen dafür, daß die Ödeme als Ausdruck einer infolge der Salzzufuhr eingetretenen abnormen Wasserverteilung zu betrachten sind.

Danach schwankt bei verschiedener Ernährungsweise der Wassergehalt des Mausorganismus etwa innerhalb derselben Grenzen. Nur bei den Karenztieren sind die ermittelten Werte um 1 % niedriger. Das entspricht den analogen Befunden von Sedlmayer[1]) und Tobler[2]). Trotzdem die Zahl meiner Versuche zu gering ist, um jeden Zufall auszuschließen, berechtigen doch die weitgehende Übereinstimmung der einzelnen Analysen untereinander und besonders die kleinere mittlere Abweichung der einzelnen Bestimmung vom Mittelwert dieser Serie mindestens dasselbe Gewicht beizulegen wie den übrigen umfassenderen. Sollte sich dies Verhalten, wie anzunehmen ist, als konstant erweisen, so dürfte die Erklärung nicht schwierig sein. Bei der Inanition schmelzen die wasserreichen Organe, z. B. das einen großen Raum einnehmende Muskelsystem, die Drüsen usw., stärker ein als die relativ wasserarmen Knochen, Zähne, Knorpel, Sehnen und namentlich das Fell, das bei kleinen Tieren wegen der relativ großen Oberfläche sehr ins Gewicht fällt. Der Wassergehalt des Gesamtkörpers wird daher sinken.

Von Interesse ist weiter der Einfluß des Darminhalts bei den verschiedenen Fütterungsweisen. Tabelle I zeigt, daß das Gewicht von Darm mit Inhalt beim Normal- und Karenztiere zwischen 1,84 und 3,59 g, beim Zuckertiere zwischen 2,30 und 4,95 g liegt, d. h. bei letzterem 0,5 bis 1,0 g höher ist. Auf das Gesamtgewicht der Tiere berechnet sich das Darmgewicht im Mittel:

für die Normaltiere zu 16 %,
" " Karenztiere " 16 %,
" " Zuckertiere " 23 %.

---

1) Sedlmayer, Zeitschr. f. Biol. 37, 25, 1898.
2) E. Tobler, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 431, 1912.

Dieses Plus von rund 7 % bei den Zuckertieren läßt sich wohl darauf beziehen, daß die zuckerreiche Nahrung wie ein salinisches Abführmittel eine Flüssigkeitsvermehrung im Darm veranlaßt. Da bei den Tieren Durchfall nie beobachtet werden konnte, kommt es immer wieder zur Resorption des überschüssigen Wassers und zur Ausscheidung durch den Harn. Vorübergehend muß aber eine so merkliche Flüssigkeitsansammlung zu einer Gewichtsvermehrung führen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß diese einen Hauptanteil an den erheblichen Gewichtsschwankungen der Zuckertiere hat.

Daß die Wasserverteilung in den Geweben bei einseitiger Fett- und Zuckerzufuhr keine Abweichung von der Norm aufweist, hat nichts Überraschendes. Anders bei den **Salztieren.** Man sollte erwarten, daß da, wo deutlich sichtbares Ödem besteht, dieses auch in einer absoluten Vermehrung des Wassers seinen Ausdruck fände. Trotzdem nun zu den Analysen nur solche Tiere ausgesucht wurden, die eine typische Halsanschwellung hatten, fällt der Mittelwert mit dem der Kontrollserie zusammen. Das läßt nun daran denken, daß die sichtbaren Ödeme nur der Ausdruck einer veränderten Wasserverteilung sind, deren Zustandekommen von osmoregulatorischen Vorgängen abhängt.

Über die Verbreitung der Aldehydbildung durch Kaliumpermanganat.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 4. August 1914.)

Gelegentlich einer Untersuchung, bei der es sich um den Nachweis von Methylalkohol nach dem Verfahren von Denigès[1]) handelte, bin ich darauf aufmerksam geworden, daß außer dem Methylalkohol auch eine große Anzahl anderer Körper dieselbe Reaktion geben. Inwieweit dadurch Verwechslungen herbeigeführt werden könnten, habe ich an einer anderen Stelle[2]) erörtert, hier möchte ich eine Anzahl von biologisch wichtigen Körpern anführen, die mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung behandelt, Aldehyd liefern. — Die Ausführung der Versuche war etwas abweichend von dem von Denigès angegebenen Verfahren.

Kleine Quantitäten der betreffenden Substanz (mit einem 1 cm breiten Nickelspatel entnommen; nach einigen Wägungen einige Zentigramm bis 0,1 g), bei flüssigen Substanzen ein bis einige Tropfen wurden mit 4 bis 5 cm verdünnter Schwefelsäure (200 g H_2SO_4, aufgefüllt zu 1 l) und 5 ccm 1 %iger Kaliumpermanganatlösung, mitunter auch einer etwas geringeren Quantität 5 %iger Lösung, zum beginnenden Sieden erhitzt, einige Minuten stehen gelassen, der Überschuß von $KMnO_4$ resp. ausgeschiedenes Mangansuperoxyd, wenn nötig, durch Zusatz gesättigter Oxalsaurelösung beseitigt und der völlig ent-

---

[1]) Chem, Centralbl. Jahrgang 1910, I, 1992.

[2]) Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- u. Genußmittel 28, 225, 1914.

färbten Flüssigkeit, ohne vollständige Abkühlung abzuwarten, einige Kubikzentimeter einer Lösung von Fuchsinschwefligsäure hinzugesetzt. Es wurde die von H. Fincke[1]) mitgeteilte Grosse-Bohlesche Lösung benutzt. Im folgenden führe ich die beobachteten Färbungen an, ohne dafür einstehen zu wollen, daß sie sich bei Nachprüfungen genau ebenso zeigen werden, im Gegenteil: ich zweifle nicht daran, daß sich bei Nachprüfungen etwas abweichende Resultate ergeben werden, abhängig von der angewendeten Menge der Substanz, des zugesetzten Kaliumpermanganats, der Dauer des Erhitzens, der Zeit der Beobachtung, die in meinen Versuchen etwa eine Stunde betrug.

Substanz	Färbung	
	direkt	nach reichlichem Salzsäurezusatz
Traubenzucker	gesättigt purpurfarben	fast unverändert
Fruchtzucker	do.	do.
Rohrzucker	do.	do.
Milchzucker	do.	do.
Raffinose	do.	do.
Galactose	violett	blau
Maltose	do.	do.
Mannose	purpurfarben	fast unverändert
Mannit	do.	do.
Amylum	do.	do.
Glykogen	do.	do.
l-Arabinose	do.	mehr bläulich
l-Xylose	do.	fast unverändert
Erythrit	do.	do.
Glycerin	gesättigt purpurfarben	do.
Glycerinphosphorsaures Calcium	purpurfarben	do.
Glucosamin	do.	do.
Gluconsaures Calcium . . .	do.	do.
Glucuronsäureanhydrid . .	fast 0	bläulich
Mentholglucuronsäure[2]) . .	do.	do.
Schleimsäure	violett	fast unverändert
Paranucleinsäure aus Casein	0	0
Casein[3])	0	0
Witte-Pepton	0	0
Eieralbumin[4])	in einem Versuch ganz schwach bläuliche Färb., in einem anderen 0	schnell verschwindend

[1]) Diese Zeitschr. 52, 219, 1913 und Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel usw. 27, 253, 1914.

[2]) Präparat von C. Neuberg.

[3]) Als trockenes Präparat und vorher in verdünnter Natronlauge gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure übersättigt.

[4]) Frisch auskoaguliert.

Substanz	Färbung	
	direkt	nach reichlichem Salzsäurezusatz
Koaguliertes Serumalbumin	0	—
Krystallisiertes Oxyhämoglobin vom Pferd . . .	0	—
Eiweiß aus Pferdebohnen (Vicia Faba L. Var. major)	0	—
Eiweiß aus Erdnuß (Arachis hypogaea)	0	—
Ovomucoid	rotviolett	blau
Mucin[1]) aus der Submaxillaris	do.	do.
Mucin aus Rindergallenblase	0	0
Dasselbe, vorher „aufgeschlossen"	fast 0	unverändert
Mucin aus Rindergalle . .	blauviolett	bläulich
Pankreasnucleoproteid . .	violett	blau
Nucleinsäure I (aus Hefe)	fast purpurfarben	do.
Nucleinsäure II aus Hefe (Natriumsalz)	violett	do.
Salicin	fast purpurfarben	fast unverändert
Amygdalin	do.	do.
Tannin	0	0
Guanin	0	0
Hypoxanthin	0	0

Hierzu sei noch folgendes bemerkt:

1. Unter Mucin „aus Rindergallenblase, aufgeschlossen" ist zu verstehen, daß dasselbe zuerst in verdünnter Natronlauge gelöst, die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure übersättigt war, ebenso wie bei Casein und Submaxillarismucin.

2. Nucleinsäure I stammt von Böhringer, Nucleinsäure II (als Natriumsalz) war mir vor längerer Zeit von der Scheringschen Fabrik, als nach A. Neumann dargestellt, zugegangen.

3. Sehr auffallend ist das Verhalten der Brenztraubensäure. In zwei Fällen trat bei 2stündiger Beobachtungszeit nicht die geringste Färbung auf, in einem dritten machte sich nach dieser Zeit eine ganz leichte bläuliche Färbung bemerkbar; in allen drei Fällen war aber die Lösung am nächsten Tage stark gefärbt, in zwei Fällen purpurrot, in einem dritten rotviolett.

[1]) Als trockenes Präparat und so wie Casein behandelt; in letzterem Fall ist die Färbung weit stärker.

Betrachtet man die Resultate, so ergibt sich in erster Linie ein prinzipieller Unterschied zwischen den Kohlehydraten und den zugehörigen Alkoholen, sowie einigen Derivaten der Kohlenhydrate einerseits und den Eiweißkörpern andererseits. Erstere reagieren positiv, letztere negativ. Dabei muß man davon absehen, daß an den Wänden des Reagensglases oberhalb der Flüssigkeit hängen gebliebene Coagula allmählich eine oberflächliche Violettfärbung annehmen. Dieselbe ist wohl auf Abdunsten der schwefligen Säure zu beziehen. Positiv reagieren ferner die Glucoside und Glucoproteide, letztere freilich lange nicht so stark, wie die Kohlenhydrate, weil diese bei der kurzdauernden Säurewirkung offenbar sehr unvollständig abgespalten werden.

Unter Umständen wird die Reaktion zur Vorprüfung eines vorliegenden Körpers auf etwaige Glucosidnatur brauchbar sein. In dieser Beziehung ist es von Interesse, daß das Tannin, obwohl es nach Emil Fischer und Freudenberg[1]) d-Glucose im Molekül enthält, negativ reagiert, augenscheinlich deshalb, weil es nach denselben Autoren nicht als einfaches Glucosid angesehen werden kann, sondern die Glucose in einer anderen Bindung enthält, die nicht so leicht gesprengt wird.

Bemerkenswert ist, daß auch das zu den Kohlenhydraten in naher Beziehung stehende Glycerin positiv reagiert.

Wie leicht ersichtlich, habe ich die Prüfung auf einige biologisch wichtige Körper beschränkt — Guanin und Hypoxanthin sind übrigens nur geprüft, um sicher zu sein, daß die bei den Nucleoproteiden resp. Nucleinsäuren eintretende positive Reaktion nicht etwa von diesen, sondern von der Kohlenhydratgruppe abhängt —, ich möchte aber diese Mitteilung nur als eine vorläufige angesehen wissen.

Ob nun bei dieser Reaktion Acetaldehyd oder irgendein anderer Aldehyd entsteht, geht aus dem Verhalten zu fuchsinschwefliger Säure nicht hervor, denn das von H. Fincke angegebene Kriterium, daß die auf Acetaldehyd beruhende Färbung durch Salzsäure zum Verschwinden kommt, ist hier, wo es sich um relativ sehr große Mengen von Aldehyden handelt, nicht anwendbar.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 915, 1912.

Für zwei der untersuchten Substanzen, nämlich für Traubenzucker und Glycerin, habe ich bereits festgestellt, daß bei der Oxydation Formaldehyd entsteht.

Versuch mit Traubenzucker.

2 g Traubenzucker wurden mit 90 ccm Wasser, 50 ccm verdünnter Schwefelsäure (200 g aufgefüllt zu 1 l) und 10 ccm 5%iger $KMnO_4$-Lösung destilliert, ca. $^2/_3$ abdestilliert.

Das Destillat gab folgende Reaktion[1]):

1. Zusatz von Große-Bohlescher Lösung ohne Salzsäure: Intensiv violette Färbung, bei starkem Salzsäurezusatz wird die Lösung dichroitisch: im auffallenden Licht blau, was namentlich beim Schütteln hervortritt, im durchfallenden Licht rot; das Blau geht bald in Grün über, die rote Färbung im durchfallenden Licht verschwindet allmählich, die ganze Flüssigkeit wird grün[2]).

2. Ansäuern einer stark verdünnten Probe mit Salzsäure, dann Große-Bohlesche Lösung: Blau.

3. Reaktion nach Bono: Intensive Blaufärbung. Diese Reaktion schließt die gleichzeitige Anwesenheit größerer Mengen von Acetaldehyd aus, in diesem Falle entsteht keine Blaufärbung, sondern vorübergehende Rotfärbung oder Mischfärbung.

4. Reaktion nach Rimini: Sehr intensiv, kirschrot.

5. Reaktion nach Leach intensiv.

Nach Zusatz von Wasser wurde aufs neue destilliert, bis die Reaktion nach Rimini im Destillat negativ ausfiel, Wasser und 10 ccm 5%ige $KMnO_4$-Lösung hinzugesetzt, destilliert. Das Destillat gab aufs neue starke Rimini-Reaktion. So wurde noch zweimal verfahren, alle Destillate gaben starke Reaktion nach Rimini, die anderen Reaktionen sind hier und da, aber nicht alle regelmäßig angestellt.

Bezüglich der Rimini-Reaktion möchte ich noch folgendes anführen: 1. Eine passend verdünnte, wenn nötig durch Alkoholzusatz geklärte, Reaktionsmischung zeigt bei der spektroskopi-

---

[1]) Bezüglich der Reaktionen sei auf die Arbeit von Fr. Simon in Bd. **65** S. 86 dieser Zeitschrift verwiesen.

[2]) Dasselbe Verhalten zeigen Formaldehydlösungen in einer Konzentration von 1 : 1000, übrigens aber auch Acetaldehyd.

schen Untersuchung einen breiten, an den Rändern verwaschenen Streifen im Grün jedoch nicht konstant. 2. Der Farbstoff geht beim Schütteln mit Amylalkohol in diesen über. 3. Beim Schütteln mit Äther färbt sich dieser citronengelb, die wässerige Flüssigkeit erscheint orange. 4. Beim Stehenlassen bis zum nächsten Tage geht die rote Farbe in Gelb über.

Die vereinigten Destillate scheiden beim Erhitzen nach Zusatz von Quecksilberchlorid Quecksilberchlorür aus, enthalten also, wie nicht anders zu erwarten war, Ameisensäure (Formaldehydlösung ist auf Quecksilberchlorid ohne Einwirkung).

Versuch mit Glycerin.

2 g Glycerin, 2 g $KMnO_4$, 100 ccm Wasser, 50 ccm verdünnte Schwefelsäure werden gemischt und destilliert, 100 ccm abdestilliert.

$^1/_{10}$ ccm des Destillates, dazu 10 ccm Wasser, 2 ccm Salzsäure, mit Große-Bohlescher Lösung versetzt: Tief blauviolette Färbung.

Sämtliche speziellen Reaktionen auf Formaldehyd fallen stark positiv aus.

Noch zweimal wurden 2 g $KMnO_4$ und 100 ccm Wasser in den Destillationskolben gebracht und destilliert, zum vierten Male 2 g $KMnO_4$, 90 ccm Wasser und 10 ccm verdünnte Schwefelsäure. Das vierte Destillat gab nur noch Andeutung von Rimini-Reaktion, im Destillierkolben war MnO_2 ausgeschieden, das sich nicht mehr löste, das Glycerin war also vollständig oxydiert.

Sämtliche Destillate, soweit noch vorhanden, wurden vereinigt. Sie enthielten, wie zu erwarten war, Ameisensäure.

Auf etwaige Anwendungen dieser Beobachtungen und sonstige Konsequenzen gehe ich zunächst nicht ein, ich möchte nur hervorheben, daß diese Art der Prüfung ein bequemes Mittel darstellt, um zu sehen, ob ein Eiweißkörper einen Kohlenhydratkomplex enthält. Man kann vielleicht sogar aus der Intensität der Färbung einen Rückschluß machen auf die Größe des Kohlenhydratkomplexes: der Unterschied in dem Verhalten des Mucins aus der Galle und Gallenblasenschleimhaut deutet darauf hin. Was die Nucleinsäuren betrifft, so ist die Feststellung der Kohlenhydratgruppe leicht und einfach, wenn es

sich um eine Pentose handelt, wie bei der Nucleinsäure aus Hefe von Böhringer, nicht aber, wenn die Orcinprobe negativ ausfällt, wie bei der in meinen Händen befindlichen, angeblich nach A. Neumann dargestellten Nucleinsäure aus Hefe. Hier ist dann die Hexose durch die vorliegende Reaktion leicht festzustellen.

Vielleicht kommt die Formaldehydbildung auch bei der Bestimmung der Milchsäure durch Überführung in Acetaldehyd in Betracht. Fürth[1]) sagt selbst in seiner letzten Mitteilung hierüber: „Ich möchte also ein für allemal gesagt haben, daß, wenn wir die aldehydgebende Substanz bei unseren Bestimmungen als Milchsäure in Rechnung setzen, dies mit der ausdrücklichen Verwahrung geschieht, daß uns vorläufig keine andere aldehydgebende Substanz bekannt ist, die das gleiche analytische Verhalten zeigt. Sollte man später einmal eine solche kennen lernen, so wird man sie bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse eben entsprechend in Rechnung ziehen müssen.“ — Es scheint mir auch zweifelhaft, ob bei dem langdauernden energischen Aussschütteln des Harns mit Äther nicht auch Spuren von Traubenzucker, sofern solcher im Harn vorhanden ist — was bei einer Reihe von Fürths Versuchen der Fall ist — in den wasserhaltigen Äther übergehen können. Weniger schwer wiegt das Bedenken, daß es sehr schwer sein möchte, etwaige aus dem Äther stammende Alkoholreste vollständig zu beseitigen, immerhin kommt auch dieses in Betracht.

Schließlich möchte ich noch auf folgendes Sachverhältnis hinweisen. Bei der Konstanz der Formaldehydbildung aus allen untersuchten Kohlenhydraten erscheint es nicht ausgeschlossen, daß auch im Organismus wenigstens ein Teil der Kohlenhydrate auf diesem Wege der Oxydation unterliegt. Dafür spricht, daß Steppuhn und Schellbach[2]) bei Hunden nach Fütterung mit 30 g Traubenzucker pro Tag eine deutliche Vermehrung der normalen Ameisensäureausscheidung im Harn festgestellt haben. Absolut genommen war die Steigerung freilich nicht erheblich. Die genannten Autoren erklären dies durch die von ihnen festgestellte teilweise Oxydation eingeführter Ameisensäure. Auf den gleichen Umstand

[1]) Diese Zeitschr. 64, 140.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 80, 274, 1912.

sind sie geneigt, auch die Beobachtung zurückzuführen, daß bei Kaninchen eine Steigerung der Ameisensäureausscheidung nach Traubenzuckerzufuhr nicht zu konstatieren war. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die zur Bildung von Ameisensäure führende Oxydation des Traubenzuckers auch im Organismus über den Formaldehyd geht. Allerdings ist Formaldehyd bisher nicht im Organismus nachgewiesen[1]). Bei der großen Reaktionsfähigkeit des Formaldehyds kann es aber nicht wundernehmen, daß er, auch wenn er vorübergehend im Organismus entsteht, doch nicht nachweisbar ist. Es ist mir nicht gelungen, bei Kaninchen nach Eingeben von 1 g Formalin (stark verdünnt) in den Magen Formaldehyd im Harn nachzuweisen, und nach den Versuchen von Fr. Simon[2]) verschwindet auch in die Blutbahn eingeführter Formaldehyd sehr schnell[3]). Ist das richtig, werden die Kohlenhydrate im Organismus in der Tat zum Teil zu Formaldehyd oxydiert, so ist es gewiß nicht ohne Interesse, daß eine Verbindung, die, wie vielfach angenommen wird, bei den Pflanzen das erste Assimilationsprodukt bei der Bildung der Kohlenhydrate ist, im Tierkörper umgekehrt das erste Oxydationsprodukt derselben darstellt.

Anmerkung bei der Korrektur. Zu meinem großen Bedauern ist es mir entgangen, daß L. Rosenthaler bereits bei einer großen Anzahl von Körpern die Bildung von Aldehyden bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat, u. a. auch die Formaldehydbildung aus Traubenzucker und Glycerin beobachtet hat (Referate in Biochem. Centralbl. 16, 672, 1914 und Chem. Centralbl. 1, 956, 1914), ihm kommt also die Priorität hierfür zu.

---

[1]) Freilich auch noch nicht gesucht!

[2]) Diese Zeitschr. 65, 71, 1914.

[3]) Nach innerlicher Verabreichung von 2 g Formalin in 60 ccm Wasser ist allerdings beim Kaninchen in dem nach einigen Stunden abgepreßten Harn von Dr. Schweriner hier Formaldehyd gefunden.

Über antigene Eigenschaften tierischen Eiweißes.

Von

Gottlieb Salus.

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 24. Juli 1914.)

In dieser Zeitschrift (Bd. 60, Heft 1) unternahmen wir zuerst den Versuch, das Pohlsche Organplasma, das einen beträchtlichen Teil des Eiweißes zelliger Gewebe darstellt, auf seine biologischen Eigenschaften zu prüfen.

Der chemischen Eigenart des Organplasmas entsprach die biologische vollkommen; statt der strikten Artspezifität des Blutserums fanden wir hier einen neuen niedrigen, weder an die Art noch an das Organ gebundenen Spezifitätsgrad, den wir als die ‚Spezifität des Organeiweißes' bezeichneten. Besonders im Anaphylaxieversuch trat diese Differenz deutlich hervor; Tiere, die beispielsweise mit Nierenplasmen einer Art vorbehandelt werden, sind nicht gegen das Blutserum der gleichen Art, dagegen selbst gegen Muskelplasmen anderer Arten überempfindlich. Der Nachweis wurde indirekt, am artfremden Tiere geführt, da der naheliegende Versuch, Tiere mit Organplasmen der eigenen Art zu sensibilisieren, uns ebensowenig gelang, als seither Friedberger und Goretti[1]) mit Organemulsionen.

Wir legten Gewicht darauf, daß eiweißreiche Antigene in frischem Zustande, besser ohne vorherige Essigsäurefällung, verwendet werden, da sich sonst die negativen Resultate bei der Reinjektion mehren und einerseits die Fehlerquelle primärer Giftigkeit, andererseits die der biologischen Denaturierung besteht.

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. usw. 21, 46.

Die Kochsalzextrakte der Organe sind in frischem Zustande, vom eben getöteten Tiere blutfrei gewonnen, nahezu ausnahmslos ungiftig; sie werden durch Stehen im Thermostaten bei 37^0, oder auch bei Zimmertemperatur ebenso regelmäßig (durch bakterielle Zersetzungen) giftig. Daher ist der Ausfall der Versuche von Friedberger und Goretti[1]), mit Organemulsionen angestellt, durchaus erklärlich; auch ist die Sensibilisierungsdauer zumeist recht kurz gewählt. Bezüglich der Kochsalzextrakte sei hervorgehoben, daß man nach der Sensibilisierung lange warten und eiweißreiche, ganz frisch bereitete Auszüge reinjizieren soll; in der warmen Jahreszeit ist diese Vorsicht doppelt geboten.

In Fortsetzung unserer oberwähnten Versuche konnten wir durch 2 malige Vorbehandlung mit Organplasmen keinen wesentlich stärkeren Erfolg erzielen; ferner waren selbst mit einem Eklampsieharn (8 p. m. Eiweiß, viele Cylinder mit Nierenepithelien) vorbehandelte Meerschweinchen nach Ablauf von 3 Wochen nur gegen Menschenserum, aber nicht gegen Organplasma überempfindlich.

Wir wollten weiter feststellen, ob sich zwischen dem artspezifischen Serumeiweiß und dem Eiweiß der Nahrung ein direkter Zusammenhang zeigen lasse; oder ob nur bereits abgebautes, unspezifisches Eiweiß ans Blut abgegeben werde und letzteres gewissermaßen in sich abgeschlossen ist in bezug auf seine spezifischen Eiweißkörper. Das Nahrungseiweiß wird durch die Verdauungssäfte seiner Eigenart entkleidet, und es fragt sich nun, ob ihm der Organismus irgendwo das eigene Spezifitätszeichen aufprägt oder nicht. Denn das Organeiweiß kann sich möglicherweise aus den unspezifischen Anteilen des Blutes aufbauen.

Zu diesen Versuchen benutzten wir Thoracicuslymphe vom Hunde[1]). Hatte diese die Artspezifität des Hundeserums, dann war anzunehmen, daß auch diejenigen Eiweißkörper des Blutes aus der Nahrung direkt herzuleiten sind, denen die Artspezifität anhaftet. Hier erwuchsen dem Versuche einige Schwierigkeiten. Um den Lymphstrang zugänglich zu machen, wurden die Hunde mit Fett gefüttert, die Lymphe war milchig, sehr

[1]) Herrn Prof. Kahn bin ich für die Vornahme der Operationen zur Gewinnung der Thoracicuslymphe sehr zu Dank verpflichtet.

fettreich, aber eiweißarm. Von je einem Tier gewannen wir nur ca. 4 ccm Lymphe, wovon öfter die letzte, rosige Portion wegen ihres Blutgehalts ausgeschaltet werden mußte. So ist es leicht begreiflich, daß wir keine komplementbindenden oder präcipitierenden Sera mit diesen geringen Mengen eiweißarmen Antigens vom Kaninchen erhielten, womit aber nicht gesagt sein soll, daß man solche nicht gewinnen kann. Dagegen versagte auch hier der Anaphylaxieversuch nicht.

I. 3 Meerschweinchen mit je 0,1 ccm Hundeserum subcutan vorbehandelt; nach 3 Wochen intravenös reinjiziert:

1. mit 0,1 ccm Hundeserum . . . . typisch anaphyl. Tod;
2. „ 0,4 „ Hundelymphe (d. th.) Krämpfe, Tod, Lungenblähung;
3. mit 0,05 ccm Hundelymphe (d. th.) Nach 3 Min. typ. Anaphylaxie bis zu allgemeinen Krämpfen; erholt.

II. 8 Meerschweinchen mit je 0,2 ccm blutfreier Thoracicuslymphe vom Hunde subcutan injiziert; intravenös reinjiziert nach 16 Tagen:

1. mit 0,40 ccm Hundelymphe heftige Krämpfe, Tod; Lungenblähung[1]);
2. mit 0,04 ccm Hundelymphe heftige Krämpfe, Tod; Lungenblähung;
3. mit 0,027 ccm Hundelymphe Pfauchen, Würgen, Kot- und Harnabgang; erholt;
4. mit 0,5 ccm Hundeserum . heftige Krämpfe, Tod; Lungenblähung;
5. mit 0,5 ccm Hundeserum . heftige Krämpfe, Tod; Lungenblähung;
6. mit 0,05 ccm Hundeserum . heftige Krämpfe, Tod; Lungenblähung;
7. mit 2,5 ccm Kaninchenmuskelplasma (E = 2 p. m. Esbach) 0
8. mit 4,0 ccm Schweinemuskelplasma (E = 4 p. m. Esbach) 0

Sämtliche Antigene sind bei unvorbehandelten Tieren unwirksam.

---

[1]) Blut, wie nicht selten, bald gerinnend.

Aus diesen Versuchen dürfen wir schließen, daß **artspezifisches Eiweiß schon zwischen Darmwand und Blutstrom auftritt**, daß zwischen diesem Blut- und dem Nahrungseiweiß ein direkter Konnex besteht, mag auch etwa weiterhin das Organeiweiß nur von bereits in der Darmwand abgebautem, unspezifischem Bluteiweiß aufgebaut werden.

Weitere Versuche bezogen sich auf das **antigene Verhalten der Leukocyten.** Hier entsteht die Schwierigkeit der doppelten Sensibilisierung durch Blutserum, da dieses stets gelöste, antigene Leukocytenstoffe enthalten wird; dem kann man dadurch aus dem Wege gehen, daß man mit sehr kleinen Serummengen, etwa 0,001 ccm, vorbehandelt; solche Tiere sind dann nur gegen Blutserum überempfindlich und reagieren auf die Reinjektion von Leukocyten nur dann, wenn letztere in so großen Mengen eingespritzt werden, daß ihnen ausreichend viel Blutserum beigemengt ist (siehe Versuch 3). Aber man bemerkt dann, daß weit größere Mengen von Leukocyten nötig sind, als bei Tieren, die gegen die betreffenden Leukocyten vorbehandelt waren. Übrigens läßt sich diese Fehlerquelle durch genügend oftmaliges Waschen mit Kochsalzlösung vermeiden[1]).

Meerschweinchen, die mit Kaninchenleukocyten vorbehandelt sind, reagieren nicht auf die Reinjektion von Meerschweinchenleukocyten; indes bewiese das nicht viel, denn aus noch unbekannten Gründen muß auch die arteigene Sensibilisierung, wie sie durch die Krystallinse erzielt wird, bei anderen nicht artspezifischen Antigenen Schwierigkeiten haben. Doch reagieren auch mit Kaninchenleukocyten vorbehandelte Meerschweinchen nicht auf die Reinjektion von Katzenleukocyten und umgekehrt. Wir müssen also annehmen, daß die **Leukocyten**, wie andere freie Zellen, **art- und organspezifisch zugleich sind.**

I. 4 Meerschweinchen mit Kaninchenleukocyten subcutan vorbehandelt, nach 3 Wochen intravenös reinjiziert:

1. mit 0,3 ccm einer Kaninchenleukocytenaufschwemmung (1 g : 10 g physiol. Kochsalzlösung) . . . fast sofort Konvulsionen, Tod;

[1]) Schattenfroh, Über die bakterienfeindlichen Eigenschaften der Leukocyten. Arch. f. Hygiene 31.

2. mit 0,4 ccm Meerschweinchenleukocytenaufschwemmung (1 : 10 g Kochsalzlösung) 0
3. mit 1,0 ccm Meerschweinchenleukocytenaufschwemmung (1 : 10 g Kochsalzlösung) 0
4. mit 2,5 ccm Schweinemuskelplasma (E = 4 p. m. Esbach) 0

II. 2 Meerschweinchen, ebenso vorbehandelt. Nach 3 Wochen intravenös reinjiziert:

1. mit 0,3 ccm Kaninchenleukocytenaufschwemmung (1 : 10) . . . Krämpfe, erholt;
2. mit 0,6 ccm Meerschweinchenleukocytenaufschwemmung (1 : 10) . 0

III. 4 Meerschweinchen, vorbehandelt subcutan mit Kaninchenserum. Intravenös reinjiziert nach 26 Tagen:

1. mit 0,3 ccm Kaninchenserum . . rascher anaph. Tod;
2. mit 0,5 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 10) 0
3. mit 0,75 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 10) . . . . Anaphylaxiespuren;
4. mit 1,5 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 10) . . . . Krämpfe, Tod.

(Die Leukocyten sind nicht serumfrei genug.)

IV. 3 Meerschweinchen, vorbehandelt mit je 0,001 Kaninchenserum subcutan. Intravenös reinjiziert nach 19 Tagen:

1. mit 0,3 ccm Kaninchenserum . . anaph. Tod;
2. mit 2,5 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 10) 0
3. mit 2,5 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 10) 0

V. 2 Meerschweinchen, vorbehandelt mit Kaninchenleukocyten. Nach 14 Tagen intravenös reinjiziert:

1. mit 2 ccm Kaninchenleukocyten (1 : 20) . . . . heftigste Krämpfe, Temperaturabfall, starrer Thorax, schließlich erholt;
2. mit 2 ccm Katzenleukocyten (1 : 20) 0

Ferner waren 2 mit Katzenleukocyten vorbehandelte Meerschweinchen nach 27 Tagen refraktär gegen große Dosen von Kaninchenleukocyten (2 und 4 ccm der 10fachen Verdünnung) und umgekehrt 3 mit Kaninchenleukocyten vorbehandelte gegen 2 bis 4,5 ccm der 10fach verdünnten Katzenleukocyten unempfindlich.

Alle Antigene wurden an normalen Tieren geprüft.

Kurz sei noch auf eine Reihe von Versuchen mit *Cerebrospinalflüssigkeit* hingewiesen. Alle mit solcher vorbehandelten Tiere sind auch gegen Blutserum überempfindlich, ein Beweis dafür, *daß das normale Liquoreiweiß aus dem Blute stammt*. Es wäre aber noch festzustellen, ob die *Zunahme* an Eiweiß, wie sie z. B. bei progressiver Paralyse vorliegt, auch aus dem Blute herrührt. E. *Weil*[1]) vermutet, daß solche Eiweißvermehrung durch Zerfall von Leukocyten oder Geweben zustande kommen könnte.

Von unseren Versuchen sei erwähnt, daß ein Paralyseliquor (2 p. m. E.), in der Menge von je 2 ccm intravenös eingespritzt, lebhafte Anaphylaxieerscheinungen auslöste a) bei zwei mit Menschenleukocyten, b) bei einem mit Kaninchenmuskelplasma vorbehandelten Meerschweinchen. Vier andere Versuche mit anderen Tabes- und Paralyseliquoren verliefen negativ. Der positive Versuch sei einstweilen nur registriert.

Wenn wir nun eine *Spezifitätsskala tierischen Eiweißes* aufzustellen versuchen, so dürfte diese etwa folgende sein:

Grade:	*Beispiele:*
I. *art- und organspezifisch* (zugleich höchster Grad)	Erythrocyten, serumfrei (U., Friedemann) Leukocyten (Spermatozoen).
II. artspezifisch	Blutserum (Bordet, Tschestowitsch, Uhlenhuth) — mit Lymphe und Liquor d. betreffenden Art (Hühnereiweiß, Eigelb).

---

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychol. **24**, Heft 5.

Grade:	Beispiele:
III. nicht artspezifisch	
a) organspezifisch	Krystallinse (Uhlenhuth, Dörr, Krusius).
b) bis zu einem gewissen Grade organspezifisch .	Uvea [A. Eschnig[1])].
c) noch antigen, aber weder art- noch organspezifisch	Organplasma (G. Salus).
IV. nicht antigen:	
a) allgemein	Gelatine, abgebautes Eiweiß.
b) für die einzelne Tierart .	arteigenes Serum.

[1]) J. Elschnig, Arch. f. Ophthal. 75, 79, 80.

Einfluß der Temperatur auf den Invertasegehalt der Hefe.

III. Mitteilung über Invertase.

Von

J. Meisenheimer und L. Semper.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

(Eingegangen am 27. Juli 1914.)

Bei Fortsetzung unserer Versuche über den Einfluß der verschiedenen Zuckerarten auf die Invertasebildung in lebender Hefe[1]) fanden wir, daß eine sehr starke Invertasevermehrung auch auftrat, als wir in unseren Nährlösungen den Traubenzucker durch Malzzucker ersetzten[2]). Da die verwendete invertasearme Hefe (gewöhnliche untergärige Bierhefe) nun aber auf einer Maltoselösung herangewachsen war, konnten wir nicht mehr wie früher den Zucker als die Hauptursache der Invertaseanreicherung betrachten. Wir gingen darauf direkt zu Vergleichsversuchen mit Bierwürze über, in der wir — zu unserer Überraschung — ebenfalls eine starke Invertasevermehrung feststellten. Nunmehr konnte die beobachtete Steigerung nur noch auf dem Einfluß der von uns gewählten, für die Unterhefe ungewohnten Versuchstemperatur (25° gegen etwa 5° Gärkellertemperatur) beruhen. Der Versuch hat diese Annahme in vollem Umfange bestätigt.

Über den Einfluß der Temperatur auf die Enzymbildung liegen unseres Wissens nur wenig Angaben in der Literatur

---

[1]) J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper, diese Zeitschr. 54, 122, 1913.

[2]) Dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund von A. Fernbach (Annales de l'Inst. Pasteur 4, 669, 1890), nach welchem auf Maltose gewachsene Hefe etwa dasselbe Inversionsvermögen besitzt als auf Rohrzucker gewachsene.

vor. Daß ein solcher Einfluß bestehen muß, hat ganz allgemein A. Kanitz[1]) in einer Arbeit ausgesprochen, in der er die bekannte Temperaturregel von van't Hoff auf biologische Vorgänge zu übertragen versuchte. Im Fall der Hefe sind die ersten Versuche über die Abhängigkeit des Enzymgehaltes von der Temperatur von A. Lange[2]) gemacht worden (Zymase, Invertase, Endotryptase), jedoch nur an abgepreßtem oder unter Wasser lagerndem Material. Bei gärender Hefe haben wir früher nach wiederholtem Umzüchten auf reiner Rohrzuckerlösung bei etwa 15° eine stärkere Invertasebildung als bei 4 bis 6° erhalten[3]), während allerdings ein späterer Versuch bei dem Intervall 15 bis 25° einen Unterschied nach dieser Richtung nicht erkennen ließ[4]), wahrscheinlich weil unter den damaligen Versuchsbedingungen schon mit 25° das Temperaturoptimum überschritten war (vgl. unten). Ebenfalls jenseits des Optimums befinden sich mit einem später mitgeteilten Versuch H. Euler und H. Cramér[5]), die beim Züchten von Hefe in Lindnerscher Nährlösung bei 38° eine geringere Invertasebildung beobachteten als bei 16° und daraus auch ihrerseits den Schluß zogen, daß „die Invertasebildung recht erheblich von der Temperatur abhängig sei"[6]).

Unsere neuen Versuche zeigen nun deutlich, daß die Temperatur für den Invertasegehalt der Hefe sogar ausschlaggebend ist; ohne Zweifel sind die früher festgestellten starken Invertaseanreicherungen zum allergrößten Teil durch Temperaturerhöhung zu erklären. Schon nach 24 Stunden kann man in Bierwürze von 25° eine Steigerung des Invertasegehalts auf das 4 bis 5fache beobachten[7]) (5 g Hefe zu 500 ccm Würze) und eine weitere Vermehrung läßt sich dann analog den früheren Versuchen auch hier durch wieder-

---

[1]) Zeitschr. f. Elektrochemie 13, 707, 1907.

[2]) Wochenschr. f. Brauerei 24, 417, 1907.

[3]) A. a. O. 138.

[4]) A. a. O. 153.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 272, 1914.

[6]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 418, 1914. Bei einem anderen Hefenenzym, der Endotryptase, konnten H. Euler und K. G. Dernby dies Ergebnis (für das Intervall 6 bis 28°) nicht wiederfinden (ebenda).

[7]) In einem Versuch bei 28 bis 30° vermehrte sich der Invertasegehalt der Hefe binnen 24 Stunden sogar auf das 8fache (Versuch IV).

holtes Umzüchten in neuer Würze erzielen, bis ein der betreffenden Temperatur entsprechender Höchstgehalt erreicht ist. Dieser wird dann bei weiterem Umzüchten ziemlich konstant beibehalten, solange die Hefe in günstigen Lebensbedingungen verbleibt und nicht nach Erschöpfung des Nährmediums der bei höherer Temperatur natürlich beschleunigt einsetzenden Autolyse preisgegeben wird, die infolge von Selbstgärung und Diffusion eine erhöhte oder auch verminderte Aktivität der Hefepräparate zur Folge haben kann (Versuch II, 2 und IV).

Daß die Invertasebildung ganz allgemein von den Ernährungsbedingungen der Hefe stark abhängt, hat zuerst A. Fernbach[1]) hervorgehoben. In ganz besonders hohem Maße scheint dies von den Beziehungen des Enzymbildungsvermögens zur Temperatur zu gelten: je besser die Ernährung der Hefe, um so höher, je schlechter, um so tiefer liegt das Optimum. Damit läßt sich erklären, daß wir das Optimum in Bierwürze bei etwa 30° fanden, daß wir es aber andererseits in reiner Rohrzuckerlösung schon bei 25° überschritten hatten. In Wasser tritt bei 25° eine nennenswerte Erhöhung des Invertasegehalts überhaupt nicht ein.

Es war vorauszusehen, daß die an höhere Temperatur gewöhnte, „hochgezüchtete“ Hefe in Bierwürze von etwa 5° ihr Enzymbildungsvermögen wieder heruntersetzen würde. Dies ist auch in der Tat allmählich der Fall (Versuch 5).

Wie längst bekannt[2]), wirkt eine Temperaturerhöhung außer auf das Invertasebildungsvermögen der Hefe auch auf das Wachstum ein. Es liegt nahe, beide Erscheinungen in unmittelbaren Zusammenhang zu bringen[3]). Eine solche Annahme scheint uns aber nicht zulässig, vor allem deshalb, weil die Invertasevermehrung im Gegensatz zum Wachstum von der Konzentration ziemlich unabhängig ist: sie wurde in 2%iger Würze (auf Maltose berechnet) annähernd ebenso groß gefun-

---

[1]) A. a. O. 641. Vgl. auch H. Euler und H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 297, 1912.

[2]) Siehe Pedersen, Meddel. fra Carlsberg Laborat. 1, 1882.

[3]) Dies würde sich übrigens auch mit der von H. Euler und H. Cramér (Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 438, 1913) vertretenen Ansicht gut vereinigen lassen, nach der die Invertasebildung an diejenigen Bedingungen geknüpft ist, unter denen eine Neubildung des Protoplasmas eintritt.

den als in 8 oder $16\,^0/_0$iger, und im ersteren Falle war im Gegensatz zu den beiden letzteren nur eine sehr geringe Vermehrung[1]) erfolgt (Versuch III). Über die mit diesem Problem zusammenhängende Frage nach dem Invertasegehalt junger Zellen sind noch Versuche im Gange.

Auffällig war, daß bei den Vergleichsversuchen im Eisschrank (Lufttemperatur 5 bis 7°) der Invertasegehalt unterer Hefe ebenfalls bis auf das Doppelte in die Höhe ging. Um zu prüfen, ob etwa die Gärung als solche hierin eine Veränderung bewirke, haben wir den Verlauf eines Gärprozesses in der hiesigen Versuchs- und Lehrbrauerei verfolgt, haben dabei aber nur recht geringe Schwankungen beobachten können (Versuch VI). Auch die Vermutung, daß die Verwendung ungehopfter Bierwürze bei einer an gehopfte gewöhnten Hefe eine Vermehrung der Invertase bedingen könne, hat sich bei der Nachprüfung als unhaltbar erwiesen (Versuch VII). Wahrscheinlich ist die im Eisschrank beobachtete Steigerung nur auf Temperaturdifferenzen infolge unzureichender Kühlvorrichtungen zurückzuführen.

Auch die „hochgezüchtete" Hefe zeigt bei der erhöhten Temperatur noch das verschiedene Verhalten gegen Glucose und Fructose, das wir vor einem Jahre bei frischer Brauereihefe beschrieben[2]). Die beiden Kohlenhydrate wurden diesmal in $2\,^0/_0$iger Lösung in Hefenwasser statt in Lindnerscher Nährlösung vergoren: auch hier besaß die auf Fructose gewachsene Hefe beträchtlich stärkere Invertasewirkung als die auf Glucose gewachsene, welch letztere ihren bisherigen Bestand nicht mehr wesentlich veränderte (Versuch II, 2 und IV).

Durch Behandeln von Hefe mit Bierwürze bei 25 bis 30° werden sich mit Leichtigkeit größere Mengen hochaktiver Preßsäfte und Präparate gewinnen lassen, die als Ausgangsmaterial für weitere Versuche dienen sollen. Ferner beabsichtigen wir, unter ähnlichen Bedingungen auch den Einfluß der Temperatur auf den Zymasegehalt der Hefe zu prüfen; Versuche darüber sind schon im Gange.

Der Schultheiß-Brauerei Berlin sind wir wieder wegen der Überlassung von Hefe zu Dank verpflichtet. Ebenso sei der

[1]) Roh bestimmt durch das Gewicht der Hefenernte.

[2]) A. a. O.

Leitung der hiesigen Versuchs- und Lehrbrauerei für die freundlichst gewährte Unterstützung bei der Ausführung eines Versuchs unser verbindlichster Dank ausgesprochen.

Experimenteller Teil.

Zur Untersuchung kamen in der Regel je 5 g abgepreßte Unterhefe in 500 ccm sterilisierter ungehopfter Bierwürze (aus der Stammwürze meist durch Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser erhalten), die beide aus der hiesigen Schultheiß-Brauerei geliefert waren. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Hefe abfiltriert oder abzentrifugiert, gewaschen, auf Ton getrocknet und zur — ungefähren — Wachstumsbestimmung gewogen. Zur Bestimmung des Invertasegehalts folgten wir wieder im allgemeinen der sehr zweckmäßigen Versuchsanordnung von Euler, indem wir die lebende Hefe in 4 Anteilen zu 0,2 g, die in je 10 ccm 1⁰/₀iger primärer Natriumphosphatlösung aufgeschwemmt waren, bei 20⁰ auf je 20 ccm 20⁰/₀iger Zuckerlösung einwirken ließen und die Inversion nach bestimmten Zeiten mit je 10 ccm 5⁰/₀iger Sodalösung abbrachen. Die Bestimmung der Drehung erfolgte bei 20⁰ im 2-dcm-Rohr; zur Berechnung der Enddrehung diente wieder der Faktor 0,32. Für die Aufstellung der am Schlusse jedes Versuchs angegebenen, auf einen gleichmäßigen Trockengehalt der Hefe umgerechneten Bilanzen wurden in der Regel nur die beiden mittleren Werte der Reaktionskonstanten *k* jedes Inversionsversuchs benutzt.

I. (23. IV. 1914.)

Invertaseveränderung der Hefe in Würze und in Wasser bei 3 bis 4⁰ und bei 25⁰.

Der Maltosegehalt der verwendeten Bierwürze betrug 7,72⁰/₀ (wasserfreie Maltose[1]). Die mit je 5 g abgepreßter Hefe und 500 ccm Würze bzw. sterilem Leitungswasser beschickten Kolben wurden teils auf Eis bei ca. 3 bis 4⁰, teils im Brutschrank bei 25⁰ aufbewahrt. Von dem Würzeversuch bei 25⁰ wurden täglich, im ganzen 6 Proben untersucht, von den übrigen Versuchen nur je 2 nach 2 und 4 Tagen.

---

[1]) Die gleiche Bierwürze wurde auch für die Versuche II, IV und V verwendet.

Ausgangshefe $\alpha_0 = 13{,}45^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,2	12,31	19,1
25,0	11,50	20,2
35,0	10,64	20,8
46,0	9,91	21,0

Trockengehalt 35,4 %.

1. In Bierwürze bei 25°:

a) nach 23 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}43^0$, $\alpha_\infty = 355{,}70^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	9,61	70,5
25	7,39	72,6
35	5,38	75,1
45	3,60	78,1

Ernte 11,8 g, Trockengehalt 24,8 %.

b) nach 46 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}39^0$, $\alpha_\infty = 355{,}72^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,2	9,35	74,6
25,0	7,13	76,0
36,0	5,01	77,5
47,5	2,90	82,3

Ernte 10,4 g, Trockengehalt 25,7 %.

c) nach 67 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}45^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$,

t	α	$K \cdot 10^4$
15,3	10,95	43,5
26,4	9,27	44,2
35,0	7,91	46,4
45,0	6,55	47,3

Ernte 9,3 g, Trockengehalt 24,9 %.

d) nach 96 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}44^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,9	9,02	78,2
29,3	5,56	87,0
35,7	4,33	87,7
47,2	2,11	93,7

Ernte 8,8 g, Trockengehalt 26,5 %.

e) nach 120 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}32^0$, $\alpha_\infty = 355{,}83^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	6,21	150
25,0	2,59	163
35,1	0,25	168
45,3	358,52	176

Ernte 5,3 g, Trockengehalt 32,7 %.

f) nach 140 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}32^0$, $\alpha_\infty = 355{,}83^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	7,79	109,0
24,7	5,12	110,0
35,0	2,55	118,0
45,0	0,83	119,5

Ernte 6,8 g, Trockengehalt 28,4 %.

2. In Bierwürze bei 3 bis 4°:

a) nach 46 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}39^0$, $\alpha_\infty = 355{,}72^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
16,0	11,63	28,4
25,0	10,69	28,7
35,3	9,73	28,5
45,0	8,81	29,0

Ernte 4,6 g, Trockengehalt 30,4 %.

b) nach 96 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}44^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	12,07	23,3
31,6	10,42	25,6
38,0	9,87	25,6
45,8	9,13	26,4

Ernte 4,1 g, Trockengehalt 30,1 %.

3. In Wasser bei 25°:

a) nach 46 Stunden.

$\alpha_0 = 13,39^\circ$, $\alpha_\infty = 355,72^\circ$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	12,16	20,7
25	11,46	20,2
35	10,51	22,0
45	9,63	23,1

Ernte 4,1 g, Trockengehalt 27,7 %.

b) nach 96 Stunden.

$\alpha_0 = 13,44^\circ$, $\alpha_\infty = 355,69^\circ$.

t	α	$K \cdot 10^4$
10	12,74	17,6
25	11,60	19,0
35	10,74	20,5
45	10,12	19,9

Ernte 4,2 g, Trockengehalt 24,1 %.

4. In Wasser bei 3 bis 4°:

a) nach 46 Stunden.

$\alpha_0 = 13,39^\circ$, $\alpha_\infty = 355,72^\circ$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,3	12,07	22,0
25,3	11,07	24,2
35,0	10,08	25,7
45,0	9,12	24,0

Ernte 4,6 g, Trockengehalt 29,2 %.

b) nach 96 Stunden.

$\alpha_0 = 13,44^\circ$, $\alpha_\infty = 355,69^\circ$.

t	α	$K \cdot 10^4$
16,2	12,14	20,5
27,0	11,22	21,5
38,1	10,40	21,4
45,3	9,92	21,2

Ernte 4,7 g, Trockengehalt 29,2 %.

Bei Umrechnung der Ernten und Reaktionskonstanten auf einen durchschnittlichen Trockengehalt der Hefe von 30 % ergibt sich:

	Aussaat	$K \cdot 10^4$
Ausgangshefe . . .	5,9	17,5

	In Bierwürze bei 25°		In Bierwürze bei 3—4°	
	Ernte	$K \cdot 10^4$	Ernte	$K \cdot 10^4$
Nach 1 Tag . . .	9,8	89,4	—	—
„ 2 Tagen . .	8,9	89,6	4,7	29,7
[„ 3 „ . .	7,7	54,6]	—	—
„ 4 „ . .	7,7	100,0	4,1	25,5
„ 5 „ . .	5,5	151,5	—	—
„ 6 „ . .	6,4	120,0	—	—
	In Wasser bei 25°		**In Wasser bei 3—4°**	
	Ernte	$K \cdot 10^4$	Ernte	$K \cdot 10^4$
Nach 2 Tagen . .	3,8	22,8	4,5	25,8
„ 4 „ . .	3,4	24,4	4,1	22,0

Das Maximum der Invertaseanreicherung und des Wachstums ist also bei dem Versuch mit Bierwürze bei 25° schon nach 24 Stunden erreicht. Die dann langsam fallenden Erntezahlen und das auch früher beobachtete Schwanken der Werte für K zeigen das allmähliche Eintreten der Autolyse an. — In Wasser ist ein Einfluß der Temperatur auf die Invertasebildung nicht zu bemerken.

II. (23. IV. 1914.)

In drei Parallelversuchen wurde die Invertaseveränderung gärender Hefe in Bierwürze bei 5 bis 7° (Eisschrank), 25° und 35° Außentemperatur beobachtet. Hierbei zeigte sich, daß die günstigste Temperatur für die Anreicherung bei 25° lag. Bei 35° erfolgte zwar ebenfalls starke Verbesserung des Invertasegehalts, doch erlitt die Hefe hierbei schon teilweise Autolyse, und deshalb wurde ihr Invertasegehalt beim Umzüchten von dem der Hefe bei 25° überholt. Bei dem Versuch im Eisschrank wurde merkwürdigerweise ebenfalls eine Invertasevermehrung beobachtet, die im Durchschnitt 100% betrug (vgl. theor. Teil).

Ausgangshefe $\alpha_0 = 13{,}68^0$, $\alpha_\infty = 355{,}63^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	12,34	22,3
25,0	11,43	23,1
35,6	10,47	23,8
45,2	9,58	24,8

Trockengehalt 34,3%.

1. Versuch bei 35°:

a) nach 20 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}62^0$, $\alpha_\infty = 355{,}64^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
20,0	8,40	74,5
26,0	7,05	75,9
35,0	5,36	76,3
45,1	3,19	83,5

Ernte 8,8 g, Trockengehalt 26,2%.

b) nach 46 Stunden.

$\alpha_0 = 13{,}56^0$, $\alpha_\infty = 355{,}66^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	9,36	77,6
25,3	6,94	79,4
35,0	4,94	81,4
41,8	3,81	81,6

Ernte 6,3 g, Trockengehalt 29,6%.

c) 4,1 g der zwei Tage lang vorbehandelten Hefe wurden mit 500 ccm neuer Bierwürze weitere zwei Tage bei 35° in Berührung gelassen. Nach dieser Zeit war sie teilweise autolysiert und deshalb sehr schlecht filtrierbar.

$\alpha_0 = 13{,}35^0$, $\alpha_\infty = 355{,}73^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
22,9	5,19	117,2
30,0	2,84	131,0
35,0	1,55	137,4
48,0	359,60	142,8

Ernte 3,7 g, Trockengehalt 33,9 %.

2. Versuch bei 25°. Die Hefe blieb je 2 Tage in je 500 ccm Bierwürze, wurde dann filtriert und nach Abnahme einer Probe zur Untersuchung wieder in einer Menge von je 5 g in neue 500 ccm Würze überführt. Dieses Umzüchten wurde im ganzen fünfmal wiederholt. Nach der fünften „Führung", bei der die Hefe 3 Tage lang gelagert hatte, war sie bereits teilweise autolysiert, doch erholte sie sich bei der nächsten Führung wieder etwas.

a) 1. Führung.

$\alpha_0 = 13{,}56^0$, $\alpha_\infty = 355{,}64^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,3	9,90	64,8
25,0	7,36	73,8
37,3	4,99	75,6
45,8	3,43	79,2

Ernte 12,2 g, Trockengehalt 24,9 %.

b) 2. Führung

$\alpha_0 = 13{,}37^0$, $\alpha_\infty = 355{,}72^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
14,8	7,67	114,3
25,4	4,27	124,0
35,2	1,68	133,2
45,3	359,95	137,0

Ernte 11,0 g, Trockengehalt 26,1 %.

c) 3. Führung.

$\alpha_0 = 13{,}52^0$, $\alpha_\infty = 355{,}62^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	7,30	124,0
25	4,04	131,4
35	1,53	137,8
45	359,72	142,8

Ernte 11,1 g, Trockengehalt 25,7 %.

d) 4. Führung.

$\alpha_0 = 13{,}17^0$, $\alpha_\infty = 355{,}78^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	7,34	118,1
25,0	4,20	125,8
35,0	1,56	136,5
45,1	359,70	143,2

Ernte 11,0 g, Troekengehalt 25,8 %.

e) 5. Führung.

$\alpha_0 = 13{,}00^0$, $\alpha_\infty = 355{,}84^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	5,34	171,2
25	1,76	185,0
35	359,35	196,3
45	357,94	202,1

Ernte 7,2 g, Trockengehalt 31,6 %.

f) 6. Führung.

$\alpha_0 = 12{,}95^0$, $\alpha_\infty = 355{,}85^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	6,67	124,2
24,9	4,16	125,7
35,4	1,67	132,1
45,1	359,82	140,3

Ernte 8,5 g, Trockengehalt 31,1 %.

g) Je 3 g der Hefe der 6. Führung wurden in je 300 ccm einer Lösung von 1 g **Glucose** bzw. **Fructose** in Hefenwasser 2 Tage bei 25° gären gelassen.

$\alpha^0 = 13{,}04^0$, $\alpha_\infty = 355{,}82^0$.

Glucose

t	α	$K \cdot 10^4$
15,5	7,08	119,0
25,0	4,28	123,2
40,3	0,81	133,2
45,9	359,92	135,5

Ernte 3,7 g, Trockengehalt 30,6%.

Fructose

t	α	$K \cdot 10^4$
14,3	6,64	141,0
24,9	2,98	152,8
35,0	0,60	158,8
46,4	358,78	165,0

Ernte 3,9 g, Trockengehalt 29,9%.

3. **Versuch bei 5 bis 7°.** Die Temperatur des benutzten Eisschrankes war nicht völlig konstant zu halten. Die Hefe wurde in 8 Anteilen zu je 5 g in je 500 ccm Bierwürze eingetragen und die angegebenen Zeiten lagern gelassen.

Nach 4 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}37^0$, $\alpha_\infty = 355{,}72^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,5	10,69	46,2
25,0	9,15	47,4
34,8	7,64	49,0
44,2	6,34	50,0

Ernte 7,2 g, Trockengehalt 28,2%.

Nach 6 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}52^0$, $\alpha_\infty = 355{,}68^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,1	11,02	43,5
25,7	9,36	45,0
36,0	7,87	45,0
45,0	6,63	47,2

Ernte 8,2 g, Trockengehalt 29,7%.

Nach 8 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}17^0$, $\alpha_\infty = 355{,}78^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,6	11,06	36,0
25,0	9,86	36,6
35,0	8,67	37,1
48,6	7,03	39,1

Ernte 8,4 g, Trockengehalt 29,5%.

Nach 11 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}00^0$, $\alpha_\infty = 355{,}84^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	10,92	37,4
25,2	9,49	39,4
35,2	8,12	41,3
45,1	6,81	43,0

Ernte 8,4 g, Trockengehalt 28,2%.

Nach 14 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}09^0$, $\alpha_\infty = 355{,}81^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,7	10,97	36,2
25,3	9,66	37,9
35,0	8,39	39,4
55,0	7,11	35,5

Ernte 8,9 g, Trockengehalt 27,5%.

Nach 20 Tagen.
$\alpha_0 = 13{,}50^0$, $\alpha_\infty = 355{,}68^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	11,48	34,7
25,2	10,15	35,8
35,5	8,74	38,1
45,0	7,59	38,9

Ernte 21,8 g (3 Versuche), Trockengehalt 28,8%.

4. Zur Kontrolle wurde die 20 Tage lang in Würze gelagerte Hefe des Versuchs 3, wieder in Anteilen von 5 g, in je 500 ccm neuer Bierwürze sowohl bei der gleichen niederen Temperatur als auch bei höherer (25°) umgezüchtet. Der Invertasegehalt blieb, wie zu erwarten, im ersten Falle annähernd konstant, im anderen vermehrte er sich wie bei Versuch 2.

a) Bei 6°: Nach 6 Tagen: $\alpha_0 = 12{,}95°$, $\alpha_\infty = 355{,}85°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	10,54	48,8
25,5	8,92	45,8
36,9	7,35	46,8
46,0	6,46	45,1

Ernte 8,3 g, Trockengehalt 28,9%.

b) Bei 25°:

Nach 36 Stunden. $\alpha_0 = 12{,}92°$, $\alpha_\infty = 355{,}86°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	8,87	79,5
25,3	6,38	83,0
35,0	4,12	90,0
47,0	2,01	94,3

Ernte 11,6 g, Trockengehalt 26,4%.

Nach 64 Stunden. $\alpha_0 = 12{,}86°$, $\alpha_\infty = 355{,}88°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	8,84	78,4
25,4	5,91	90,0
35,0	3,78	95,0
45,0	1,97	99,0

Ernte 9,7 g, Trockengehalt 27,2%.

Die Umrechnung der Reaktionskonstanten sowie der Aussaaten und Ernten auf einen durchschnittlichen Trockengehalt von 36% ergibt:

Ausgangshefe: $K \cdot 10^4 = 20{,}5$.

	Versuch bei 25°			Versuch bei 35°		
	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
1. Führung nach 1 Tag	5,7	—	—	5,7	7,7	87,2
1. " " 2 Tagen	5,7	10,1	89,6	5,7	6,2	81,5
2. Führung	4,2	9,6	148,0	4,0	4,2	119,0
3. "	4,3	9,5	157,0	—	—	—
4. "	4,3	9,5	153,0	—	—	—
5. "	4,3	7,6	182[1]	—	—	—
6. "	5,3	8,8	125,0	—	—	—
7. Führung in Hefenwasser + Glucose	3,1	3,8	126,0	—	—	—
8. Führung in Hefenwasser + Fructose	3,1	3,9	157,0	—	—	—

[1]) Daß die Gesamtproduktion an Invertase hier trotz der höheren Reaktionskonstante schon abgenommen hat, ergibt der Vergleich des Wertes für Ernte $\times K \cdot 10^4$ (1380) mit dem der vorangehenden Führung (1450)

Kontrollversuch in Bierwürze bei 5 bis 7°. Ausgangshefe wie oben.

	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
Nach 4 tägigem Lagern . .	5,7	6,8	51
„ 6 „ „ . .	5,7	8,1	45
„ 8 „ „ . .	5,7	8,3	38
„ 11 „ „ . .	5,7	7,9	42
„ 14 „ „ . .	5,7	8,2	41
„ 20 „ „ . .	5,7	7,0	39

Umzüchtung der Hefe des letzten Versuchs in neue Würze:

	bei 5 bis 7°			bei 25°		
	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
Nach $1^1/_2$ Tagen	—	—	—	4,8	10,2	96
„ 3 „	—	—	—	4,8	8,8	102
„ 6 „	4,8	8,0	48	—	—	—

III. (31. III. 1914.)

Invertaseanreicherung in Würzen verschiedener Konzentrationen.

Die hier benutzte Stammbierwürze enthielt 16,2 °/₀ (wasserhaltige) Maltose. Sie wurde teils direkt zur Züchtung bei 25° benutzt, teils nach vorheriger Verdünnung, bis sie in bezug auf wasserhaltige Maltose 2 °/₀ig geworden war (62 ccm in 500 ccm). Von der nach 2 Tagen erhaltenen Hefe der 1. Führung wurden bei dem Versuch mit Stammwürze je 5 g in neue Würze bei 25° eingetragen und wieder nach 2 Tagen verarbeitet, und ebenso bei der 2. Führung. Bei dem Versuch mit verdünnter Würze war die Hefe der 1. Führung 2 Tage in der Würze gelassen, die der 2. Führung $3 + 3^1/_2$ Tage.

Ausgangshefe. $\alpha_0 = 13{,}54^0$, $\alpha_\infty = 355{,}67^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	12,19	22,7
30,8	10,77	23,7
46,5	9,17	26,0
59,5	8,04	26,9

Trockengehalt 32,6 °/₀.

1. Führung. $\alpha_0 = 12{,}92^0$, $\alpha_\infty = 355{,}86^0$.

Stammwürze.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,3	9,14	71,2
30,7	5,89	75,2
45,8	3,25	79,2
60,0	1,04	86,3

Ernte 14,2 g, Trockengehalt 28,0%.

2%ige Würze.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	9,08	73,8
30	5,66	80,4
45	2,99	84,3
61	0,97	85,7

Ernte 6,6 g, Trockengehalt 23,8%.

2. Führung.

Stammwürze.

$\alpha_0 = 15{,}70^0$, $\alpha_\infty = 354{,}97^0$ [1]).

t	α	$K \cdot 10^4$
15,5	10,71	77,0
30,0	6,31	87,3
50,5	2,18	90,6
60,0	0,55	95,0

Ernte 13,6 g, Trockengehalt 28,2%.

2%ige Würze.

$\alpha_0 = 13{,}00^0$, $\alpha_\infty = 355{,}84^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	7,10	121,8
34,8	2,70	114,4
44,8	359,90	139,5
60,0	358,06	147,8

Ernte 6,2 g, Trockengehalt 26,5%.

3. Führung. $\alpha_0 = 13{,}00^0$, $\alpha_\infty = 355{,}84^0$.

Stammwürze.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,6	7,54	106,5
30,0	3,57	115,0
45,0	0,57	124,2
60,0	358,63	131,2

Ernte 13,3 g, Trockengehalt 28,6%.

Reduktion auf 30% Trockengehalt:

Ausgangshefe. $K \cdot 10^4 = 22{,}9$:

	Stammwürze			2%ige Würze		
	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
1. Führung . . .	5,4	14,2	83	5,4	5,2	104
2. „ . . .	4,7	13,2	95	5,2	5,5	144
3. „ . . .	4,7	12,8	125	—	—	—

Obwohl kaum gewachsen, zeigt die mit 2%iger Würze von 25° behandelte Hefe ein Inversionsvermögen von derselben Größenordnung — sogar noch etwas größer — als die mit Stammwürze behandelte.

[1]) Infolge eines Versehens wurde hier eine etwas konzentriertere Zuckerlösung zur Inversion benutzt als gewöhnlich.

IV. (15. VI. 1914.)

Einfluß von Glucose und Fructose auf das Inversionsvermögen hochgezüchteter Hefe.

Wie der Versuch II, 2, zeigt auch der folgende, daß bei einer an höhere Temperatur gewöhnten Hefe die Invertasevermehrung auf fructosehaltiger Nährlösung stärker ist als auf glucosehaltiger. Zur Vermeidung jeglicher Autolyse wurde die Hefe sowohl beim Heranzüchten wie beim eigentlichen Versuch nur je einen Tag in der Würze belassen und dann sofort umgezüchtet. Bei der 1. und 2. Führung wurden je 5 g Hefe auf 500 ccm Bierwürze, bei der 3. und 4. Führung 7,5 g Hefe auf 750 ccm Bierwürze verwendet. Die Temperatur des Brutschrankes betrug während der ganzen Dauer des Versuchs 28 bis 30°.

1. Hochzüchten der Hefe. 4 Führungen, die den Invertasegehalt sogar bis auf das $8^1/_2$ fache steigerten.

Ausgangshefe.
$\alpha_0 = 12{,}88^0$, $\alpha_\infty = 355{,}88^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	11,93	16,7
25,0	11,27	17,3
35,0	10,51	18,6
45,4	9,82	19,0

Trockengehalt 37,5%.

1. Führung.
$\alpha_0 = 12{,}77^0$, $\alpha_\infty = 355{,}91^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,3	8,07	92,9
25,0	5,51	97,8
35,0	3,25	103,0
45,0	1,34	109,2

Trockengehalt 25,9%.

2. Führung.
$\alpha_0 = 13{,}46^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	7,93	107,9
25,4	4,76	115,0
36,3	1,88	126,2
45,0	0,48	126,2

Ernte 10,4 g, Trockengehalt 28,4%.

3. Führung.
$\alpha_0 = 12{,}99^0$, $\alpha_\infty = 355{,}83^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	7,39	114,2
25	4,58	117,1
35	2,19	123,1
45	0,62	123,1

Ernte 15,5 g, Trockengehalt 29,5%.

4. Führung. $\alpha_0 = 12{,}99^0$, $\alpha_\infty = 355{,}83^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
25,3	5,67	95,3
36,2	3,32	99,4
45,0	1,76	102,6

Ernte 14,0 g, Trockengehalt 28,6%.

2. Je 5 g dieser hochgezüchteten Hefe wurden mit einer Lösung von 10 g Glucose bzw. Fructose in 500 ccm Hefenwasser versetzt. 2 Führungen, je 1 Tag dauernd.

1. Führung. $\alpha_0 = 12{,}51^0$, $\alpha_\infty = 355{,}99^0$.

Glucose.

t	α	$K \cdot 10^4$
25	0,96	139,8
35	3,38	148,8

Ernte 7 g, Trockengehalt 28,7 %.

Fructose.

t	α	$K \cdot 10^4$
25,0	2,30	167
35,1	359,76	183

Ernte 6,8 g, Trockengehalt 31,8 %.

Je 5 g hiervon wurden umgezüchtet.

2. Führung. $\alpha_0 = 12{,}51^0$, $\alpha_\infty = 355{,}99^0$.

Glucose[1]).

t	α	$K \cdot 10^4$
22,7	4,91	117,5
35,0	2,03	124,7
45,0	0,45	126,2
55,0	358,89	137,1

Ernte 6,2 g, Trockengehalt 26,5 %.

Fructose[1]).

t	α	$K \cdot 10^4$
25,0	2,40	164,2
35,1	359,95	176,5
45,0	358,45	183,6
55,0	357,65	181,5

Ernte 6,4 g, Trockengehalt 27,7 %.

Reduktion auf 30 % Trockengehalt:

Ausgangshefe. $K \cdot 10^4 = 14{,}4$:

	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
1. Führung . . .	6,3	—	120
2. „ . . .	—	9,9	126
3. „ . . .	4,7	10,1[2])	123
4. „ . . .	4,9	9,0[3])	102

	Versuch mit					
	Glucose			Fructose		
	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
1. Führung . . .	4,8	6,7	151	4,8	7,2	165
2. „ . . .	4,8	5,5	137	5,3	5,8	185

[1]) Es wurden hier nur die nach 25 und 30 Minuten Inversion erhaltenen Werte für die Aufstellung der Bilanz verwandt.

[2]) $^3/_2$ der gefundenen Ernte (s. o.).

[3]) $^3/_2$ der gefundenen Ernte. Die Ernte war wohl deshalb niedriger, weil der Versuch schon nach 19 Stunden statt nach 24 Stunden aufgearbeitet wurde.

V. (25. VI. 1914.)
Erniedrigung des Invertasegehalts hochgezüchteter Hefe durch Gärung bei niederer Temperatur.

Von der Hefe der dritten Führung des vorigen Versuchs wurden 5 g in 500 ccm Bierwürze, die durch Einstellen in Wasser auf 5 bis 6° gekühlt war, zur Gärung gebracht. Die Hefe klumpte hierbei zusammen, erzeugte aber noch ziemlich lebhafte Gärung. Von Zeit zu Zeit wurde umgeschüttelt. Bei der 2. und 3. Führung wurden nur je 3 g Hefe in 500 ccm Würze ausgesät. Das Wachstum war in allen Fällen auffallend gering.

1. Führung (nach 7 Tagen). $\alpha_0 = 12{,}67°$, $\alpha_\infty = 355{,}82°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
16,3	7,48	99,3
25,0	5,08	105,0
35,0	2,83	110,0
45,0	0,81	119,0

Ernte 5,2 g, Trockengehalt 29,6 %.

2. Führung (nach 8 Tagen). $\alpha_0 = 13{,}65°$, $\alpha_\infty = 355{,}62°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	9,97	66,3
25,0	7,56	71,7
35,0	5,46	75,2
45,4	3,45	77,8

Ernte 4,5 g, Trockengehalt 33,3 %.

3. Führung (nach 8 Tagen). $\alpha_0 = 12{,}97°$, $\alpha_\infty = 355{,}84°$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	10,20	51,1
25,0	8,52	52,3
35,4	6,60	56,9
45,0	4,84	62,2

Ernte 3,8 g, Trockengehalt 32,3 %.

Reduktion auf 30 % Trockengehalt:
Ausgangshefe $K \cdot 10^4 = 14{,}4$. 3. Führung $K \cdot 10^4 = 123$ (Vers. IV).

	Aussaat	Ernte	$K \cdot 10^4$
1. Führung . .	4,9	5,1	109
2. „ . .	3,0	5,0	66
3. „ . .	3,2	4,1	51

VI. (18. V. 1914.)
Invertaseveränderung während einer Führung der Hefe in der Brauerei.

Die Prüfung einer im Betriebe der hiesigen Versuchs- und Lehrbrauerei befindlichen Bierhefe (Rasse U) während der Dauer einer Führung (Nr. 5) ergab ein annäherndes Konstantbleiben des Invertasegehaltes. Die Temperatur des Gärkellers betrug 5°, die des Gärgutes wurde zwischen 8 bis 9° gehalten. Nach den angegebenen Zeiten wurden 2 bis 3 l der gärenden Flüssigkeit abgehebert und zentrifugiert. Die letzte Probe

wurde nach Beendigung der Gärung, nach 9 Tagen, aus der abgesetzten und gewaschenen Hefe entnommen.

Anstellhefe. $\alpha_0 = 13{,}07^0$, $\alpha_\infty = 355{,}82^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
20,0	11,55	20,0
25,5	11,09	20,7
35,0	10,45	20,3
45,6	9,72	20,5

Trockengehalt 26,9 %.

Nach 1 Tag. $\alpha_0 = 13{,}26^0$, $\alpha_\infty = 355{,}76^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,2	12,27	16,6
25,0	11,38	19,7
35,7	10,51	20,8
45,0	9,48	23,5

Trockengehalt 26,3 %.

Nach 2 Tagen. $\alpha_0 = 13{,}50^0$, $\alpha_\infty = 355{,}68^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	12,30	20,2
25	11,52	20,4
35	10,69	21,3
45	9,91	21,7

Trockengehalt 25,9 %.

Nach 4 Tagen. $\alpha_0 = 12{,}92^0$, $\alpha_\infty = 355{,}86^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	11,81	19,4
25	11,13	19,3
35	10,41	19,7
45	9,61	20,8

Trockengehalt 30,6 %.

Nach 9 Tagen. $\alpha_0 = 13{,}14^0$, $\alpha_\infty = 355{,}79^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,1	11,91	21,2
25,0	11,02	22,6
35,0	10,03	24,5
45,5	9,17	24,8

Trockengehalt 29,6 %.

Reduktion der Reduktionskonstanten auf 30 % Trockengehalt:

	$K \cdot 10^4$
Anstellhefe . . .	22,9
Nach 1 Tage . . .	23,2
„ 2 Tagen . .	24,2
„ 4 „ . .	19,1
„ 9 „ . .	23,9

VII. (27. V. 1914.)

Einfluß gehopfter und ungehopfter Würze auf den Invertasegehalt der Hefe.

Die nach Beendigung der Gärung erhaltene Hefe des vorhergehenden Versuches wurde in Anteilen von je 5 g in je 500 ccm gehopfter und ungehopfter Bierwürze eingeführt,

die beide aus der gleichen Stammwürze bereitet und uns von der hiesigen Versuchs- und Lehrbrauerei freundlichst zur Verfügung gestellt waren. Temperatur des Eiskastens 5 bis 7°.

1. Nach 9 Tagen. $\alpha_0 = 13{,}44^0$, $\alpha_\infty = 355{,}69^0$.

Gehopfte Würze.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	11,69	30,1
25	10,54	30,9
35	9,31	32,9
45	8,14	34,3

Trockengehalt 31,3 %.

Ungehopfte Würze.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	11,71	29,7
25	10,56	30,7
35	9,47	31,4
45	8,36	32,6

Trockengehalt 30,4 %.

2. Nach 12 Tagen. $\alpha_0 = 13{,}17^0$, $\alpha_\infty = 355{,}78^0$.

t	α	$K \cdot 10^4$
15	11,70	25,5
25	10,76	25,8
35	9,77	26,9
45	8,75	28,3

Trockengehalt 30,1 %.

t	α	$K \cdot 10^4$
15,0	11,51	29,0
25,0	10,52	28,7
35,3	9,51	29,1
45,0	8,43	30,7

Trockengehalt 29,6 %.

Reduktion auf einen Trockengehalt von 30 %:

	Gehopfte Würze	Ungehopfte Würze
Ausgangshefe . .	23,9	23,9
Nach 9 Tagen . .	30,6	30,7
„ 12 „ . .	26,3	29,3

Ein sicherer Unterschied zwischen beiden Versuchen war also nicht zu bemerken.

Zur Methodik der Lecithinbestimmung in Milch.

Von

N. A. Brodrick-Pittard.

(Aus der Schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.)

(Eingegangen am 28. Juli 1914.)

In einer Reihe von Arbeiten wurde das Vorhandensein von organischen Phosphorsäureverbindungen in der Milch, die als Lecithin[1]) angesprochen worden sind, wahrscheinlich gemacht. In neuerer Zeit waren es namentlich Burow[2]) und Nerking und Haensel[3]), die über die Lecithine der Milch gearbeitet haben. Auf Veranlassung von R. Burri haben wir uns auch mit dieser wichtigen Frage befaßt.

Da uns an der Arbeitsweise von Burow einige wenig einleuchtende Umstände aufgefallen sind, haben wir zunächst eine diesbezügliche Nachprüfung unternommen. Burow bringt die Eiweißstoffe der Milch in der Weise zur Gerinnung, daß er tropfenweise Milch zu einem Gemisch gleicher Volumina von Alkohol und Äther unter Zusatz von einigen Tropfen 30%iger Essigsäure fließen läßt. Das Filtrat von der Eiweißfällung wird nun in einer Porzellanschale bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur im Thermostaten zum zähen Sirup eingedampft, um so den Äther und den Alkohol und das gesamte Wasser zu vertreiben. Den hierbei erhaltenen Sirup hat Burow mit reinem, wasserfreiem Äther erschöpfend ausgelaugt.

Wir beobachteten nun, daß ein in angegebener Weise erhaltenes ätherisches Extrakt nach Verjagen des Äthers ohne

[1]) Der Ausdruck Lecithin soll in vorliegender Mitteilung nichts anderes als die Gesamtheit der durch Äther und Chloroform extrahierbaren organischen Phosphorsäureverbindungen bedeuten.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 495.

[3]) Diese Zeitschr. **13**, 348, 1908.

vorhergehendes Aufschließen mit Soda-Salpetergemisch eine Phosphorsäurereaktion zeigte. Es mußte sich also eine anorganische Phosphorsäureverbindung dem Ätherextrakt beigemischt haben, bzw. der wasserfreie Äther hatte offenbar aus dem Sirup Wasser und damit anorganische Phosphate aufgenommen. Um dieses zu umgehen, wurde versucht, den Sirup möglichst wasserfrei zu machen. Zu diesem Zwecke ist bei einem weiteren Versuche das Filtrat sechs Tage im Thermostaten bei 36° stehen gelassen worden. Doch verhinderte die sich hierbei bildende feste Kruste eine vollkommene Trocknung des Extraktes. Es ergab sich somit die Notwendigkeit, den Sirup vor der Extraktion mit Äther mit einem Trockenmittel zu behandeln; hierbei kamen wasserfreies Chlorcalcium und geglühtes Natriumsulfat in Betracht. Da aber Chlorcalcium infolge seiner schwachen Basizität eine Verseifung des Lecithins verursachen könnte, wurde dem wasserfreien Natriumsulfat der Vorzug gegeben.

Daß die Löslichkeit der anorganischen Phosphate in wasserhaltigem Äther nicht vernachlässigt werden darf, mußte auch aus folgenden Versuchen geschlossen werden. Nachdem das mit Natriumsulfat getrocknete Extraktionsgut im Soxhletapparat nachweislich vollkommen mit Äther ausgezogen war, wurden einige Kubikzentimeter destilliertes Wasser in die Hülse gegeben. Nachher wurde wiederum 6 Stunden lang mit Äther extrahiert. Das hierbei erhaltene ätherische Extrakt ergab nach Vertreiben des Äthers ohne vorheriges Aufschließen eine sehr kräftige Fällung mit Molybdänlösung.

Um ferner festzustellen, ob das Lecithin bei der Fällung der Eiweißkörper durch das Alkohol-Äthergemisch quantitativ in dieses übergegangen sei, wurde der Niederschlag bei einer größeren Zahl von Analysen nach dem Abtrennen des Fällungsmittels im Thermostaten gut getrocknet und nachher während 3 Stunden im Soxhletapparat extrahiert. Bei dieser Kontrolle konnte in keinem einzigen Falle eine Spur organischer Phosphorsäureverbindungen im Extrakte nachgewiesen werden. Es war auch von vornherein zu erwarten, daß das Lecithin bei der durch die besondere Arbeitsweise bedingten feinen Verteilung in dem großen Überschusse von Alkohol und Äther löslich sei.

Da die Lecithine im Chloroform leichter löslich sind als im Äther, wurden vergleichende Extraktionen mit Äther und

Chloroform in der Weise angesetzt, daß man einmal das Extraktionsgut zuerst mit Äther und dann mit Chloroform, ein andermal umgekehrt zuerst mit Chloroform und dann mit absolutem, über metallischem Natrium getrocknetem Äther auszog.

Folgende Zahlen sind z. B. bei einer Mischmilch und einer Colostrummilch erhalten worden:

1. 100 ccm einer Mischmilch ergaben:

bei der Ätherextraktion	a)	0,0171 g	Lecithin
	b)	0,0194 g	"
bei der darauf folgenden Chloroformextraktion	a)	0,0141 g	"
	b)	0,0125 g	"

2. 100 ccm einer Colostrummilch:

bei der Ätherextraktion	a)	0,0353 g	Lecithin
	b)	0,0384 g	"
bei der darauf folgenden Chloroformextraktion	a)	0,0091 g	"
	b)	0,0094 g	"

Es wurde also mit Hilfe von Chloroform, nachdem das Extraktionsgut mit Äther erschöpfend extrahiert worden war, sowohl bei der Mischmilch als bei der Colostrummilch noch eine beträchtliche Menge von Lecithin gewonnen. Im Gegensatz hierzu erhielt man beim umgekehrten Verfahren, d. h. wenn man zuerst mit Chloroform extrahierte, sofort quantitative Ausbeuten, so daß im nachträglich erhaltenen Ätherauszuge in keinem Falle Phosphate gefunden wurden. In mehreren Kontrollversuchen war festgestellt worden, daß anorganische Phosphate von dem zur Verwendung kommenden Chloroform pur. extra Ph. H. nicht gelöst werden.

Mit obigen Befunden übereinstimmende Resultate ergaben auch eine größere Anzahl anderer Versuche, die hier nicht angeführt sind. Auch diese sprechen dafür, daß in der Milch wenigstens zwei verschiedene Lecithine vorliegen, die sich durch eine verschiedene Löslichkeit in den benutzten Lösungsmitteln unterscheiden.

Wir haben nun, gestüzt auf letztere Befunde, folgendes Arbeitsverfahren eingeschlagen:

100 ccm Milch werden tropfenweise zu dem Äther-Alkoholgemisch gegeben und das Ganze während 6 Stunden in der

Schüttelmaschine geschüttelt. Hierauf wird von den auskoagulierten Eiweißkörpern abfiltriert, das Filtrat in einer Porzellanschale bei 36° im Thermostaten eingeengt und so weit wie möglich getrocknet. Die zurückbleibende Substanz wird mit der 2 bis 3 fachen Menge fein gepulverten, frisch geglühten Natriumsulfats vorsichtig verrieben, quantitativ in eine Extraktionshülse übergeführt und alsdann mit Chloroform extrahiert. Die Extraktion dauert 3 bis 4 Stunden. Das Chloroformextrakt wird alsdann in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand nach Bedecken mit einem aschefreien Filter auf offener Flamme verkohlt. Darauf wird mit Soda-Salpetergemisch eine vollständige Aufschließung der organischen Phosphorverbindungen herbeigeführt, die Schmelze in verdünnter Salpetersäure gelöst und darin die Phosphorsäure nach Woy[1]) bestimmt. Durch Multiplikation der gefundenen Phosphormolybdänverbindung mit 0,43 läßt sich die entsprechende Menge Lecithin berechnen. Der Bestimmung nach Woy hat man deshalb den Vorzug gegeben, weil methodische Fehler, die bei der geringen Phosphorsäuremenge schwierig auszuschließen sind, auf diesem Wege weniger in Betracht fallen.

Vergleichende Untersuchungen nach der Burowschen und nach der von uns befolgten Methode lieferten folgende Resultate:

100 ccm Milch mit einem Fettgehalt von 5 °/₀ ergaben:

nach Burow	0,1236 g	Lecithin
nach unserer Methode . .	0,0189 g	"

Das erste Gemelk einer Colostrummilch mit 6,25 °/₀ Fett wurde nach Burow gefällt und das Filtrat auf 2 l aufgefüllt. Hiervon wurden in aliquoten Teilen Lecithinbestimmungen vorgenommen

		in 100 ccm Milch	
nach Burow		0,2145 g	Lecithin
nach unserer Methode . .	a)	0,0253 g	"
	b)	0,0317 g	"

Indem wir uns des Chloroforms statt des Äthers bei der Extraktion bedienen, tritt unser Verfahren in Beziehung zu demjenigen von Nerking und Haensel[2]). Diese Autoren bestimmen Lecithin in der Milch in folgender Weise: 100 ccm

[1]) Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chem. 5. Aufl. S. 361.

[2]) l. c.

Milch werden mit 200 ccm Alkohol unter Umrühren gefällt; nachdem sich der Niederschlag gut abgesetzt hat, wird filtriert, das Filter samt Niederschlag in die Hülse eines Soxhletapparates gebracht und nun mindestens 30 Stunden mit Chloroform ausgezogen. Das alkoholische Filtrat wird bei 50 bis 60° verdunstet, der Rückstand mit Chloroform bis zur Erschöpfung ausgezogen und dieser Auszug mit dem zur Extraktion des Filters und Niederschlags benutzten Chloroformauszug vereinigt. Die vereinigten Auszüge werden in der Platinschale verdunstet, der Rückstand mit Soda-Salpetermischung vorsichtig verascht und in der Asche die Phosphorsäure als pyrophosphorsaure Magnesia über die Stufe des Ammoniummolybdophosphates bestimmt.

Wie ersichtlich, wird die Fällung in anderer, weniger rationell erscheinender Weise durchgeführt und für eine vollständige Entfernung des Wassers werden keine Vorkehrungen getroffen.

Dieser Umstand veranlaßte uns, die Einwirkung des Trocknens auch für diese Methode analytisch festzustellen, und zwar haben wir in dem einen Falle den Niederschlag vor dem Extrahieren getrocknet und in dem andern Falle ist streng nach der Vorschrift von Nerking und Haensel gearbeitet worden, d. h. der Rückstand ist ohne vorherige Trocknung mit Chloroform ausgezogen worden. Die Ergebnisse sind folgende:

100 ccm Milch mit 4 % Fett ergaben:

1. nach Nerking-Haensel:

a) getrockneter Rückstand . .	0,0041 g	Lecithin
Filtrat	0,0271 g	„
	0,0312 g	Gesamt-Lecithin
b) getrockneter Rückstand . .	0,0029 g	Lecithin
Filtrat	0,0275 g	„
	0,0304 g	Gesamt-Lecithin
c) nicht getrockneter Rückstand	0,0053 g	Lecithin
Filtrat	0,0251 g	„
	0,0304 g	Gesamt-Lecithin
d) nicht getrockneter Rückstand	0,0096 g	Lecithin
Filtrat	0,0262 g	„
	0,0358 g	Gesamt-Lecithin
2. Nach unserer Methode . a)	0,0267 g	„
b)	0,0254 g	„

Um die Einwirkung des Trocknens noch näher zu untersuchen, sind weitere Versuche in der Weise angesetzt worden, daß einerseits Rückstand und Filtrat getrocknet wurden und daß andererseits die Extraktion ohne Trocknen durchgeführt wurde.

So ergaben 100 ccm Milch mit einem Fettgehalt von 4,4% folgende Zahlen:

a)	getrockneter Rückstand . .	0,0040 g Lecithin
	getrocknetes Filtrat	0,0306 „ „
		0,0346 g Gesamt-Lecithin
b)	getrockneter Rückstand . .	0,0028 g Lecithin
	getrocknetes Filtrat	0,0278 „ „
		0,0306 g Gesamt-Lecithin
a)	nicht getrockneter Rückstand	0,0110 g Lecithin
	nicht getrocknetes Filtrat . .	0,0321 „ „
		0,0431 g Gesamt-Lecithin
b)	nicht getrockneter Rückstand	0,0079 g Lecithin
	nicht getrocknetes Filtrat . .	0,0383 „ „
		0,0462 g Gesamt-Lecithin

Wie aus diesen und den obigen Ergebnissen deutlich hervorgeht, wird durch das Trocknen sowohl im Rückstand wie im Filtrat die Menge der schließlich erhaltenen Phosphormolybdänverbindung herabgesetzt.

Dieses Resultat führte uns dazu, unsere Methode mit derjenigen von Nerking-Haensel zu vergleichen, und zwar geschah dies in der Weise, daß die gemachten Erfahrungen hierbei berücksichtigt wurden und daß man auch beim Extrahieren des Lecithins nach Nerking-Haensel Filtrat und Rückstand vor der Extraktion gut trocknete.

Zu erwähnen ist noch, daß die Hauptmenge des Lecithins sich im Filtrat befindet; die Extraktion des Rückstandes ist in 2 bis 3 Stunden beendigt. Da durch eine 30 stündige Extraktion keine weitere Vermehrung erreicht wurde, ist die Extraktionsdauer entsprechend reduziert worden. Im Mittel betrug der Lecithingehalt im Rückstande nicht mehr wie 2,5 mg.

Diese Bestimmungen ergaben folgende Resultate:

1. 100 ccm einer Milch mit 3,95% Fett:

nach Nerking-Haensel (unter Trocknung von Rückstand und Filtrat) . .	a) 0,0460 g Lecithin
	b) 0,0311 g „
nach unserer Methode	a) 0,0249 g „
	b) 0,0283 g „

2. 100 ccm einer anderen Milch mit ebenfalls 3,95 % Fett:
nach Nerking-Haensel (unter Trocknung von Rückstand und Filtrat) . . . . . . 0,0390 g Lecithin
nach unserer Methode . . . . 0,0323 g „

Aus diesen Resultaten ergibt sich, daß unsere Befunde in gewissem Gegensatze zu denjenigen von Nerking-Haensel stehen, indem wir für Lecithin nie so hohe Werte gefunden haben wie diese Autoren. Die vorsichtige Entfernung des Wassers aus Rückstand und Filtrat hat allerdings zur Folge, daß beim Arbeiten nach Nerking-Haensel merklich niedrigere Werte erhalten werden; doch sind diese immer noch größer als die nach unserer Methode gefundenen.

Nachdem nun eine als zuverlässig erscheinende Methode zur Bestimmung des Lecithins gefunden worden war, wurde sie auf eine größere Zahl von Milchproben angewendet. Die Resultate sind folgende:

1. 100 ccm Milch, Fettgehalt 3,95 %, ergaben:
a) 0,0249 g Lecithin
b) 0,0283 g „

2. 100 ccm Milch, Fettgehalt 3,95 %, ergaben:
a) 0,0353 g Lecithin
b) 0,0365 g „
c) 0,0323 g „

3. 100 ccm Milch, Fettgehalt 4,00 %, ergaben:
0,0349 g Lecithin

4. 100 ccm Milch, Fettgehalt 4,35 %, ergaben:
a) 0,0261 g Lecithin
b) 0,0254 g „
c) 0,0254 g „

5. 100 ccm Milch, Fettgehalt 5,27 %, ergaben:
a) 0,0312 g Lecithin
b) 0,0319 g „

100 ccm des 3. Gemelkes (Colostrum) der Kuh „Arve“ lieferten:
a) 0,0261 g Lecithin
b) 0,0206 g „

100 ccm des 5. Gemelkes (Colostrum) der Kuh „Arve“ lieferten:

a) 0,0245 g Lecithin
b) 0,0212 g „
c) 0,0222 g „

100 ccm des 7. Gemelkes (Colostrum) der Kuh „Arve“ lieferten:

a) 0,0446 g Lecithin
b) 0,0478 g „

100 ccm des 2. Gemelkes (Colostrum) der Kuh „Bella“ lieferten:

a) 0,0467 g Lecithin
b) 0,0425 g „

Aus der Betrachtung dieser Zahlen ergibt sich, daß der Lecithingehalt der Milch Schwankungen unterworfen ist, die sich durch die Individualität der Tiere, Alter, Stand der Lactation usw. erklären lassen. Aus diesem Grunde und infolge des sehr geringen Gehaltes an Lecithin ist die Bestimmung dieses Milchbestandteiles zur Feststellung der Qualität der Milch nicht als erfolgversprechend anzusehen. Im übrigen ist die Bestimmung eine so langwierige und kostspielige, daß sie sich, würde auch der Gehalt an Lecithin ein konstanterer sein, wohl schwerlich in der Praxis einbürgern dürfte. Erwähnung verdient noch die Beobachtung, daß der Lecithingehalt in den meisten Fällen mit dem Fettgehalt ansteigt; dieser Befund steht im Widerspruch zu den Resultaten von Nerking und Haensel.

Weiterhin sind auch Bestimmungen des Lecithins in Vorbruch, Vorbruchbutter, Rahm und Rahmbutter durchgeführt worden. Es war nämlich nicht ohne Interesse, festzustellen, ob der Minderwertigkeit der Vorbruchbutter gegenüber der Rahmbutter bezüglich des Geschmackes auch eine Minderwertigkeit der Zusammensetzung entsprechen würde.

Es ergaben 100 ccm Vorbruch:

Fettgehalt 2,65 % . . . . 0,0328 g Lecithin
„ 3,65 % . . . . 0,0384 g „
„ 4,75 % . . . . 0,0555 g „

Auch bei diesen Zahlen ist ein Anwachsen des Lecithingehaltes mit der Zunahme des Fettes zu beobachten.

Zur Bestimmung des Lecithins in der Vorbruchbutter wurden 15 g derselben im Thermostaten mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und während 12 Stunden extrahiert.

1. 15 g Vorbruchbutter enthielten: a) 0,0294 g Lecithin,
b) 0,0284 g "
2. 15 g " " : 0,0178 g "

100 ccm Rahm, 15 % Fett, lieferten folgende Resultate:
a) 0,0914 g Lecithin
b) 0,0892 g "

15 g Rahmbutter enthielten:
a) 0,0225 g Lecithin
b) 0,0220 g "
c) 0,0215 g "

Beim Vergleich dieser Zahlenreihen ergibt sich, daß die für die Gewinnung des Vorbruchs nötige Temperatur von 80° im Gegensatz zu den von Bordas und Raczkowski[1]) gemachten Angaben keine Zersetzung des Lecithins verursacht zu haben scheint, mit anderen Worten, daß kein Unterschied in der Qualität der Vorbruch- und Rahmbutter in bezug auf den Gehalt an Lecithin besteht.

Schlußfolgerungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man wie folgt zusammenfassen:

1. Bei der Bestimmung des Lecithins ist großes Gewicht auf vollkommene Trocknung des Extraktionsgutes zu legen; das Außerachtlassen dieses Umstandes erklärt zum Teil die auseinandergehenden Resultate anderer Autoren.

2. Der Gehalt der Milch an Lecithin scheint in gewisser Hinsicht von der Lactationszeit und der Individualität der Milchtiere abhängig zu sein.

3. Der Lecithingehalt der Milch scheint mit deren Fettgehalt zuzunehmen.

4. Die Qualität der Vorbruchbutter in bezug auf den Lecithingehalt steht derjenigen der Rahmbutter nicht nach.

---

[1]) Compt. rend. 136, 56, 1902.

Zur Kenntnis der Assimilation von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze.

Von

Alexander Kossowicz (Wien).

(Eingegangen am 2. Juli 1914.)

In einer Serie von Arbeiten[1]) konnte ich den Nachweis für die Assimilation verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, die sowohl allgemeineres physiologisches als auch Interesse vom landwirtschaftlichen Standpunkt bieten, so von Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure, Glykokoll, Guanidin, Guanin, Rhodanverbindungen, Kalkstickstoff, Nitriten und Nitraten, durch eine Anzahl weitverbreiteter, teils als Zersetzer von Nahrungs- und Genußmitteln, teils durch ihre Pflanzen- oder Tierpathogenität bekannter Schimmelpilze, bringen.

Meine früher veröffentlichten Untersuchungen wurden in der bei Ernährungsversuchen mit Schimmelpilzen gewöhnlich geübten Weise in mit Wattestopfen verschlossenen Glaßgefäßen (meist Erlenmeyer-Kölbchen) vorgenommen. Da stets Kontroll-versuche ohne den betreffenden Nährstoff ausgeführt wurden, in denen es zu einem Pilzwachstum nicht kam, erscheinen sie jedenfalls beweiskräftig. Zwei Umstände bewogen mich aber, einen Teil dieser Versuche mit gänzlich verschiedener, wesentlich komplizierterer Versuchsanstellung zu wiederholen: Die Möglichkeit der Aufnahme des elementaren Stickstoffs der Luft und verschiedener in der Luft, speziell in der Laboratoriumsluft, vorhandener Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Die von mehreren Autoren hervorgehobene Bindung des elementa-

---

[1]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgemeine, landw. und techn. Mykologie 1, 60, 121, 124, 317; 2, 51, 55, 59, 81, 84, 1912; 2, 154, 1913; 3, 321, 1913. — Kossowicz, Einführung in die Agrikulturmykologie, 1. Teil: Bodenbakteriologie, Berlin 1912.

ren Stickstoffs der Luft durch Schimmelpilze kommt nach meinen kürzlich in dieser Zeitschrift mitgeteilten Versuchsergebnissen[1]) allerdings meiner Ansicht nach nicht mehr in Frage. Hingegen konnte eine Aufnahme unbekannter Verbindungen durch in Nährlösungen gezüchtete Schimmelpilze aus der Laboratoriumsluft in Bestätigung von Befunden, die durch Elfving[2]) an Schimmelpilzen, Beyerinck und van Delden[3]) an Bakterien, Klöcker[4]) an Hefen (Sproßpilzen) gemacht wurden, von mir erneut festgestellt werden. Als ich die hier folgenden Versuche begann, rechnete ich allerdings auch noch mit der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Schimmelpilze.

Sowohl bei meinen älteren als auch bei den hier angeführten Versuchen handelte es sich für mich vor allem um die ernährungsphysiologische Frage, ob die betreffenden Verbindungen den geprüften Schimmelpilzen, darunter vorwiegend solchen, die daraufhin überhaupt noch niemals untersucht wurden, als Kohlenstoffnahrung bzw. Stickstoffnahrung dienen können, eine rein qualitativ zu lösende Frage. Von ganz sekundärer Bedeutung erscheint die weitere Frage, ob mehr oder weniger von der betreffenden Substanz von dieser oder jener Pilzart in längerer oder kürzerer Zeit verzehrt wird, und bildet eine Arbeit für sich, die auch nur dann in wissenschaftlich befriedigender Weise gelöst werden kann, wenn auch zuvor festgestellt wird, ob die in Anwendung kommende Nährlösung, die Züchtungstemperatur und noch mancherlei andere Faktoren eine vergleichende Prüfung überhaupt gestatten. Sie lag vorläufig nicht mehr in meinem Plan. Wichtig erschien mir aber die Feststellung der Zwischen- und Stoffwechselprodukte, worauf ich jedoch erst in einer späteren Abhandlung in ausführlicher Weise zurückkommen werde. Pilzgewichtsbestimmungen wurden nicht ausgeführt. Derartige Pilzgewichtsbestimmungen, so gut sie sich auch manchmal in einer Abhandlung ausnehmen mögen und für die Gründlichkeit des

---

[1]) Diese Zeitschr. 64, 82, 1914.

[2]) Elfving, Studien über die Einwirkung des Lichtes auf die Pilze, Helsingfors 1890.

[3]) Centralbl. f. Bakt. 10, 33, 1903.

[4]) Compt. rend. du labor. de Carlsberg 10, 99, 1911.

Forschers Zeugnis ablegen, sind mit so großen Fehlerquellen behaftet (die große Schwierigkeit des Auswaschens der Nährlösung, die lange Dauer und Ungleichmäßigkeit des Trocknens, der ungleiche Wassergehalt, die Hygroskopizität, die kleinen Gewichtsmengen, bei denen auch geringfügigere Differenzen stark zum Ausdruck kommen, die Abhängigkeit von der Größe der Pilzeinsaat, der Temperatur usw.), daß ihnen, außer etwa für besondere vergleichende Untersuchungen, meiner Ansicht nach so gut wie gar kein Wert zukommt, um so mehr als man ja größere Unterschiede ohnehin mit freiem Auge ebenso gut wahrnehmen und durch die Bezeichnungen „gute kräftige Entwicklung, Deckenbildung, Depotbildung, sehr spärliche Entwicklung, Bildung einzelner Flocken, Ausbleiben jeder Entwicklung“ auch dem Leser verdeutlichen kann.

Zu den im nachfolgenden beschriebenen Versuchen wurden je 100 ccm der betreffenden in Erlenmeyer-Kölbchen befindlichen Nährlösung verwendet. Um die in der Luft befindlichen organischen Verbindungen von der Nährlösung abzuhalten, wurden die Versuchskölbchen nach der Beimpfung mit der entsprechenden Schimmelpilzkultur, die mit einem Platindraht erfolgte, wobei neben wenigen Mycelfäden einzelne Konidien bzw. Sporen aus einer gut entwickelten Pilzkultur auf in Eprouvetten befindlichen Kartoffelstreifen in die Nährlösung übertragen wurden, mit Vorlagen verbunden, die konzentrierte Schwefelsäure, dann Kalilauge, ferner eine Kaliumpermanganatlösung und destilliertes Wasser enthielten.

Die Versuchsdauer betrug 4 Wochen. Die Versuchstemperatur schwankte zwischen 16 und 20°.

Zur Verwendung kamen Reinzuchten genau und sicher bestimmter Schimmelpilze, und zwar von Aspergillus glaucus, Aspergillus niger, Botrytis Bassiana, Cladosporium herbarum, Isaria farinosa, Penicillium glaucum, Penicillium brevicaule, Phytophthora infestans, Mucor γ Boidin und eines roten Farbstoff bildenden Fusariums (Fusisporium G).

Die genannten Pilze stammen aus der k. k. landw. bakt. Versuchsstation in Wien, die sie seinerzeit aus dem Laboratorium Kral in Prag bezogen hatte. Sie wurden von mir nachgeprüft, mit neuen Zuchten aus dem Laboratorium Kral

in Wien verglichen und identisch befunden und später dem letztgenannten Laboratorium zur Verfügung gestellt. Eine Ausnahme bildet das Fusarium, das, wie mir mitgeteilt wurde, unter dem Namen Fusisporium G seinerzeit von Herrn Regierungsrat Appel der Versuchsstation in Wien zur Verfügung gestellt wurde. Den übernommenen Namen Mucor Boidin für Amylomyces bzw. Mucor Rouxii behielt ich bei. Bei dieser Gelegenheit kann ich nicht umhin, zu bemerken, daß bei physiologischen Versuchen, die ergeben sollen, ob eine bestimmte chemische Verbindung in irgendeiner Weise ausgenutzt oder zersetzt werden kann, es von besonderer Wichtigkeit ist, daß tatsächlich sicher bestimmte Reinzuchten von Pilzen verwendet werden, das Herauszüchten von Pilzen aus irgendwelchen Substraten, wie Erde, Dünger usw. und die Anwendung dieser Pilze zu derartigen Versuchen ist bei der außerordentlichen Schwierigkeit, welche die genaue Pilzbestimmung auch dem geübten Mykologen verursacht, der großen Unsicherheit, die auf diesem Gebiete herrscht, nicht empfehlenswert. Interessante Angaben hierüber findet der Leser in einer kritischen Abhandlung von v. Höhnel[1]) und einer zweiten von Weese[2]), die sich mit den Zuständen in den einzelnen Teilen der speziellen Mykologie befassen. Wenn z. B. Bierema[3]) von einem dem „Cordiceps militaris sehr ähnlichen Pilz“ und einem „wahrscheinlich mit Septosporium bifurcum Fres. identischen Pilz“ spricht, die Hippursäure zersetzen, so hat er wohl bloß den sehr allgemein gehaltenen, schon früher vorhandenen Nachweis (Shibata[4]) geliefert, daß es auch Schimmelpilze gibt, die Hippursäure zersetzen. Etwas anderes ist es, wenn es sich bloß darum handelt, festzustellen, was für Pilze in einem zu prüfenden Substrat vorkommen und wie sie sich in physiologischer Beziehung verhalten. Da tritt aber eben die Aufgabe des Pilzsystematikers in den Vordergrund. Rein wissenschaftlich-physiologische Fragen können in einwandfreier

---

[1]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. und techn. Mykologie 4, 207, 1914.

[2]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. und techn. Mykologie 3, 214, 1913.

[3]) Centralbl. f. Bakt. 23, 672, 1909; Dissertation Leipzig 1909.

[4]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 388, 1904.

Weise nur mit genau und sicher bestimmten Reinzuchten gelöst werden, „sehr ähnliche“ und „wahrscheinlich identische“ Pilze taugen dazu nicht und sind derartige physiologische Feststellungen ziemlich wertlos.

Bezüglich der weiteren Literatur über das Verhalten der Pilze zu den verschiedenen hier angeführten chemischen Verbindungen verweise ich auf meine zu Beginn dieser Abhandlung und bei den einzelnen Verbindungen zitierten Arbeiten.

Versuche.

I. Harnstoff[1]).

a) Harnstoff als Kohlenstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 4 g Harnstoff, 1 g KNO_2, 1 g NH_4NO_3, 0,5 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Die eingangs erwähnten 10 Pilze kamen darin nicht zur Entwicklung.

b) Harnstoff als Stickstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 4 g Harnstoff, 10 g Saccharose (reinst), 1 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und Spuren von $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zu kräftiger Entwicklung und Deckenbildung. In einer sonst gleich zusammengesetzten Nährlösung, die aber 10 g Mannit (reinst) statt Saccharose als Kohlenstoffquelle enthielt, trat ebenfalls Entwicklung aller geprüften Schimmelpilze ein, nur ging sie wesentlich langsamer vor sich. In den beimpften Kontrolllösungen ohne Harnstofftrat keine Entwicklung ein.

Alle daraufhin geprüften Schimmelpilze vermögen Harnstoff wohl als Stickstoffquelle, nicht aber als Kohlenstoffquelle auszunützen.

II. Harnsäure[2]).

a) Harnsäure als Kohlenstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Harnsäure, 1 g KNO_2, 1 g NH_4NO_3, 0,5 g NH_4Cl, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur NaOH, $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Alle 10 Schimmelpilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

---

[1]) Vgl. auch Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. und techn. Mykologie 1, 60, 121, 317; 2, 51, 81, 1912.

[2]) Vgl. auch Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. und techn. Mykologie 1, 60, 121, 317; 2, 51, 81, 1912.

b) **Harnsäure als Stickstoffquelle.** Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Harnsäure, 10 g Saccharose (reinst), 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur NaOH, $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Schimmelpilze kamen in dieser Nährlösung und in einer solchen, die statt Saccharose Mannit enthielt, zur Entwicklung und Deckenbildung.

Die geprüften Pilze nützen Harnsäure sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle aus. In den beimpften harnsäurefreien Kontrollösungen kam es zu keiner Pilzentwicklung.

III. Hippursäure[1]).

a) **Hippursäure als Kohlenstoffquelle.** Die Nährlösung bestand aus 1000 ccm destilliertem Wasser, 2 g Hippursäure, 1 g KNO_3, 1 g NH_4NO_3, 0,5 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und einer Spur $CaSO_4$, NaOH und $FeCl_3$. Sämtliche 10 Pilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

b) **Hippursäure als Stickstoffquelle.** Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Hippursäure, 10 g Saccharose (reinst) (in einer zweiten Serie statt Saccharose 10 g Mannit), 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur NaOH, $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung. Die geprüften Pilze nutzen Hippursäure als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle aus. In den mit den Schimmelpilzen beimpften hippursäurefreien Kontrolllösungen trat keine Entwicklung ein.

IV. Glykokoll[2]).

a) **Glykokoll als Kohlenstoffquelle.** Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 4 g Glykokoll, 1 g KNO_3, 1 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zur Entwickung und Deckenbildung.

b) **Glykokoll als Stickstoffquelle.** Die Nährlösung bestand aus: 1000 ccm destilliertem Wasser, 2 g Glykokoll, 10 g Saccharose (reinst) bzw. Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, einer Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

---

[1]) Vgl. Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. u. techn. Mykologie 1, 60, 121, 317; 2, 51, 81, 1912.

[2]) Ebenda.

Es nutzen somit die geprüften Schimmelpilze Glykokoll sowohl als Kohlenstoffquelle als auch als Stickstoffquelle aus. In den mit Schimmelpilzen beimpften glykokollfreien Kontrollnährlösungen kam es zu keiner Pilzentwicklung.

V. Guanin[1]).

a) Guanin als Kohlenstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Guanin, 1 g KNO_3, 1 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

b) Guanin als Stickstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Guanin, 10 g Saccharose (reinst) bzw. 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

Guanin wird von den Schimmelpilzen als Kohlenstoffquelle und als Stickstoffquelle verwendet. In den mit den Pilzen beimpften guaninfreien Kontrollösungen trat keine Entwicklung ein.

VI. Guanidin hydrochloricum und Guanidin carbonicum[2]).

a) Guanidin hydrochloricum und Guanidin carbonicum als Kohlenstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Guanidin carbonicum bzw. 2 g Guanidin hydrochloricum, 1 g KNO_3, 1 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Die Pilze zeigten auch nach Ablauf von 6 Wochen nur ganz geringfügige Flockenbildungen, keine deutliche Entwicklung.

b) Guanidin hydrochloricum und Guanidin carbonicum als Stickstoffquelle. Die Nährlösung bestand aus: 1000 ccm destilliertem Wasser, 2 g Guanidin hydrochloricum, bzw. Guanidin carbonicum, 10 g Saccharose (reinst) bzw. 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, einer Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Schimmelpilze kamen zur Entwicklung und Deckenbildung.

---

[1]) Ebenda 2, 84, 1912.

[2]) Vgl. Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. u. techn. Mykologie 2, 84, 1912.

Guanidin wurde von den Pilzen wohl als Stickstoffquelle, nicht aber als Kohlenstoffquelle ausgenutzt.

VII. Kaliumrhodanat (KCNS)[1]).

a) Kaliumrhodanat als Kohlenstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g KCNS, 1 g KNO_2, 1 g NH_4Cl, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaSO_4$ und $FeCl_3$. Nach Verlauf von 6 Wochen war bloß in einzelnen Versuchsgefäßen schwache Flockenbildung wahrzunehmen, zu einer wirklichen Pilzentwicklung war es nicht gekommen.

b) Kaliumrhodanat als Stickstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g KCNS, 10 g Saccharose (reinst) bzw. 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Die Pilze zeigten nach 4 Wochen eine zwar schwache, aber deutliche Entwicklung und schwache (zum Teil unterbrochene) Deckenbildung.

In den Kontrollnährlösungen ohne Kaliumrhodanat kam es zu keiner Pilzentwicklung. Die Pilze konnten Kaliumrhodanat wohl als Stickstoffquelle, nicht aber als Kohlenstoffquelle ausnützen.

VIII. Nitrit als alleinige Stickstoffquelle[2]).

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KNO_2, 10 g Saccharose (reinst) bzw. 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zu kräftiger Entwicklung und Deckenbildung.

IX. Nitrat als alleinige Stickstoffquelle.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KNO_3, 10 g Saccharose (reinst) bzw. 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle 10 Pilze kamen zu kräftiger Entwicklung und Deckenbildung.

---

[1]) Ebenda 2, 59, 1912.

[2]) Vgl. auch Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. u. techn. Mykologie 2, 55, 1912; 3, 321, 1913.

X. Kalkstickstoff als alleinige Stickstoffquelle[1]).

Die Kalkstickstofflösung wurde durch Filtration (durch Berkefeldfilter) sterilisiert. Sie hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Kalkstickstoff, 10 g Saccharose (reinst), 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $FeCl_3$ und eine Spur Salzsäure. Das ungelöste Salz (Niederschlag) wurde nicht mit verwendet, so daß die eigentliche Konzentration der Nährlösung (Salzgehalt) eine viel niedrigere war. Alle 10 Schimmelpilze kamen zu einer allerdings nur schwachen Entwicklung und zeigten nach Verlauf von einigen (2 bis 4) Wochen auch schwache Deckenbildung.

Die hier angegebenen Versuche wurden nicht bloß unter Verwendung einer wesentlich abweichenden Versuchsanordnung, die einen Ausschluß der in der Laboratoriumsluft befindlichen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen ermöglicht, durchgeführt, auch die benutzten Nährlösungen waren von den früher herangezogenen vielfach in der Zusammensetzung und Konzentration verschieden. Darauf ist auch zurückzuführen, daß manche Pilze, die zur Assimilation von Harnsäure, Guanin und Kalkstickstoff in den früher veröffentlichten Versuchen nicht veranlaßt werden konnten, sich in diesen neuen Versuchen als kräftige Assimilanten erwiesen. Es liegt also auch nach dieser Richtung eine Erweiterung meiner Befunde vor, die im übrigen durch die neuen Versuche eine Bestätigung erfuhren.

Die Befunde lassen sich daher wie folgt zusammenfassen:

Bei Ausschluß der in der Laboratoriumsluft stets vorhandenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch entsprechende Versuchsanordnung zeigten Reinzuchten der eingangs erwähnten 10 Schimmelpilze, die recht verschiedenen Gruppen des Pilzreiches angehören und in der Natur stark verbreitet sind, die Fähigkeit, Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure, Glykokoll, Guanin, Guanidinverbindungen, Nitrite, Nitrate und Kalkstickstoff als alleinige Stickstoffquelle zu assimilieren. Als Kohlenstoffquelle wurden von den angeführten, als solche überhaupt in Betracht kommenden Verbindungen, nur Harnsäure, Hippursäure, Glykokoll und Guanin, nicht aber Harnstoff, Guanidin und Kaliumrhodanat ausgenützt.

---

[1]) Der Kalkstickstoff stammt aus einer Fabrik in Sebenico. Vgl. Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. u. techn. Mykologie 1, 124, 1912; 2, 154, 1913.

Über das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen zu Nitraten.

I. Mitteilung.

Von

Alexander Kossowicz (Wien).

(Eingegangen am 27. Juli 1914.)

Hagem[1]) sagt im Jahre 1910 in seinen Untersuchungen über norwegische Mucorineen: „Jedoch dürfen wir wohl sagen daß unsere Kenntnis von der pilzlichen Nitratassimilation eine sehr lückenhafte ist. Erstens liegen über das Verhalten der verschiedenen Pilzabteilungen, Gattungen und Arten nur äußerst spärliche Erfahrungen vor, und zweitens wissen wir von den chemischen Prozessen, die sich bei der Nitratassimilation abspielen, gar nichts.“ Damit präzisiert **Hagem** recht gut den damaligen Stand dieser Frage. Im Jahre 1910 wurden nun auch die hier vorliegenden Untersuchungen, und zwar zunächst von mir allein, begonnen, die ergaben, daß sämtliche daraufhin untersuchte Schimmelpilze, die recht verschiedenen Gruppen des Pilzreiches angehören, Nitrat assimilieren können[2]). Von Interesse erschien es nun weiter festzustellen, in welcher Weise die Assimilation der Nitrate erfolgt, denn die übliche Prüfung des Assimilationsprozesses mit **Neßler**schem Reagens, wie sie von **Hagem** durchgeführt wurde, ergibt bei Verwendung zuckerhaltiger Nährlösungen, wie ich[3]) dies schon an

---

[1]) **Oskar Hagem**, Untersuchungen über norwegische Mucorineen. II. Videnskabs-Selskabets Skrifter, I. Math. Nat. Kl. **1910**, Nr. **4**, S. 26.

[2]) Al. **Kossowicz**, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem. landw. u. techn. Mykologie **2**, 55, **1912**; **3**, 322, 1913.

[3]) Al. **Kossowicz**, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie **1**, 519, 1912; **2**, 57, 1912; **3**, 321, 1913.

anderer Stelle nachweisen konnte, ganz unverläßliche und nicht genügend beweiskräftige Resultate. Zu einem Teil dieser weiteren Versuche wurden auch meine Schüler, die Herren J. Hanisch (1911/12) und W. Loew (1912/13) herangezogen[1]). Im Jahre 1911 erschien auch eine Abhandlung von G. E. Ritter[2]), die unsere Kenntnisse über die Nitratassimilation durch Schimmelpilze wesentlich erweiterte, ohne allerdings näheren Einblick in den Chemismus der Nitratassimilation zu gewähren.

Vor der Besprechung der eigenen Versuche soll eine kurze Übersicht der über die Nitratassimilation durch Schimmelpilze bestehenden, ziemlich spärlichen Literatur gegeben werden, aus der auch ersichtlich wird, daß von den einzelnen Autoren meist vielfach einander widersprechende Resultate erhalten wurden, ein Umstand, der für sich allein eine Neuaufnahme und Überprüfung der früheren Versuche rechtfertigt, ganz abgesehen davon, daß auch Pilze in den Kreis unserer Beobachtungen gezogen wurden, deren physiologisches Verhalten bisher im allgemeinen nur sehr lückenhaft erforscht erscheint und die in bezug auf Nitratassimilation überhaupt noch nicht untersucht worden sind.

Über die Nitratreduktion durch Pilze äußert sich im Jahre 1868 Schönbein[3]) in einer kürzeren Notiz: „Schwämme und Pilze überhaupt zerlegen nach meinen Beobachtungen H_2O_2 sehr lebhaft, und alle die von mir bis jetzt untersuchten Pflanzen dieser Art verhielten sich zu den Nitraten wie Konferven, die Hefe usw., was mehr als nur wahrscheinlich macht, daß alle Pflanzenmaterialien, die das Wasserstoffsuperoxyd zu katalisieren vermögen, auch die salpetersauren in salpetrigsaure Salze umwandeln können.“

Im Jahre 1878 konnten Schlösing und Müntz[4]) feststellen, daß Aspergillus niger, Penicillium glaucum, Mucor Mucedo und Mucor racemosus Nitrat assimilieren und unter Ammoniakbildung reduzieren.

Bemerkenswert erscheinen die Schlußfolgerungen von Nägeli und O. Loew[5]). Sie betonen, daß Salpetersäure von Schimmelpilzen nach

---

[1]) Al. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie 2, 55, 58, 1912; 3, 322, 325, 1913.

[2]) G. E. Ritter, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 570, 1911.

[3]) C. F. Schönbein, Journ. f. prakt. Chem. 105, 208, 1868.

[4]) Schlösing und Müntz, Compt. rend. Paris 86, 892, 1878.

[5]) Nägeli und O. Loew, Sitzungsber. d. kgl. bayer. Akad. d. Wissenschaften München 10, 277, 1880.

vorheriger Umwandlung in Ammoniak assimiliert wird. Salpetrige Säure als Zwischenprodukt konnte nicht nachgewiesen werden, so daß den beiden Forschern die Möglichkeit der direkten Umwandlung des Nitrats in Ammoniak ohne Ausscheidung des intermediär wahrscheinlich gebildeten Nitrits gegeben erscheint. Auch in seinen „Untersuchungen über niedere Pilze" bestritt Nägeli[1]) die Fähigkeit der Schimmelpilze zur Nitratreduktion.

E. Laurent[2]) konnte in einer Nährlösung von der Zusammensetzung 1000 ccm Wasser, 5,75 g Kaliumphosphat, 0,1 g Magnesiumsulfat, 6,07 g Natriumnitrat und 2,5 g Saccharose, bei einer Versuchstemperatur von 20 bis 22°, eine Nitratreduktion zu Nitrit durch Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum, Alternaria tenuis und Mucor racemosus, nicht aber durch Aspergillus glaucus, Aspergillus niger und Botrytis cinerea feststellen, Wir finden hier einen Gegensatz zu den Angaben von Nägeli[3]) bzw. Nägeli und Loew[4]) und zum Teil auch zu jenen von Schlösing und Müntz[5]).

Nach den Angaben von Went und Prinsen Geerligs[6]) vermag Chlamydomucor Oryzae Nitrate und Nitrite nicht als Stickstoffquelle zu verwerten. K. Wolf[7]) fand, daß Mucor Mucedo Nitrat zu Nitrit reduziert und daß bei Eintritt einer kräftigen alkoholischen Gärung auch die salpetrige Säure verschwindet. Czapek[8]) berichtet, daß Aspergillus niger auf Nitraten gut gedeiht und in Ammoniumnitratlösung ein besseres Wachstum zeigt (Pilztrockengewicht auf 1%ige Lösung und 3%igen Zucker 213,2 mg) als in Kaliumnitratlösung (Pilzgewicht 157,6 mg). Butkewitsch[9]) und Nikitinsky[10]) beobachteten ein besseres Pilzwachstum auf Ammonsulfat, als auf Ammonnitrat.

In den Versuchen von Ritter[11]) zeigten Thamnidium elegans, Mucor Mucedo und Rhizopus nigricans in 1%igen Nitratlösungen (5% Traubenzucker und 1% KNO_3) „fast keine Entwicklung"; besser war sie auf Ammonnitrat. Ritter bestätigte auch die Feststellung von E. Laurent[12]), daß Aspergillus glaucus, Clados-

---

[1]) Nägeli, Unters. über niedere Pilze 1882, S. 45.
[2]) E. Laurent, Bull. de l'Acad. de Belgique 20, 309, 1890.
[3]) Nägeli, a. a. O.
[4]) Nägeli und Loew, a. a. O.
[5]) Schlösing und Müntz, a. a. O.
[6]) Went und Prinsen Geerligs, Ref. im Centralbl. f. Bakt. 1, 501, 504, 1895.
[7]) K. Wolf, Hygienische Rundschau 9, 546, 1899.
[8]) F. Czapek, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 47, 1903.
[9]) Butkewitsch, Jahrb. f. wissensch. Botan. 38, 212, 1902.
[10]) Nikitinsky, Jahrb. f. wissensch. Botan. 40, 12, 1904.
[11]) G. E. Ritter, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, 582, 1909.
[12]) E. Laurent, a. a. O.

porium herbarum und Mucor racemosus auf KNO_3-Lösung besser gedeihen, als auf Ammonsulfat-Nährlösung.

O. Hagem[1]) prüfte eine große Anzahl von Mucor-Arten auf ihr Verhalten zu Kaliumnitrat unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen. Während einige dieser Mucor-Arten, wie z. B. Mucor racemosus, ein sehr gutes Wachstum in Nitratlösungen zeigten, war jenes anderer sehr spärlich. Der Reduktionsvorgang wurde mit dem Grießschen Reagens, mit Jodkaliumstärke und mit dem Neßlerschen Reagens geprüft. Doch wurde diese Prüfung nicht fortlaufend in ein und derselben Kultur ausgeführt, sondern nach willkürlich bemessenen Zeiträumen die Versuchsnährlösung einer einzigen Prüfung unterzogen. Wie ich[2]) schon an anderer Stelle bemerkt habe, können aber nur fortgesetzte, zu verschiedenen Zeiten an ein und derselben sich weiter entwickelnden Zucht (event. Parallelzuchten) ausgeführte Untersuchungen über derartige Ernährungsvorgänge der Pilze verläßlicheren Aufschluß geben. Dieser Umstand gibt zum Teil auch schon die Erklärung der von Hagem beobachteten großen Ungleichmäßigkeit in der Nitratreduktion durch Mucor-Arten, die Hagem z. B. folgendermaßen charakterisiert: „Ich muß hier gleich bemerken, daß die Nitritreaktion selbst mit dem äußerst empfindlichen Grießschen Reagens nicht immer auftritt, vielmehr aber in ihrem Auftreten von noch nicht klargelegten Verhältnissen abhängt", und an anderer Stelle: „Das Auftreten von Ammoniak ist in den meisten Nitratkulturen mit Neßlers Reagens leicht nachweisbar, doch ist auch hier in einzelnen Versuchen diese Reaktion beinahe negativ ausgefallen"[3]). Allerdings wäre noch mit einer anderen Möglichkeit zu rechnen, nämlich mit der, daß es auch Pilze gibt, die nicht, wie allgemein angenommen wird, das Nitrat vor der Assimilation zu Nitrit und dann zu Ammoniak reduzieren und dann erst letzteres assimilieren, sondern entweder 1. als Nitrat direkt assimilieren, 2. zu Nitrit reduzieren und als solches assimilieren, 3. zu Ammoniak direkt reduzieren und als solches assimilieren (Nägeli und Loew). Für die Wahrscheinlichkeit einer direkten Assimilation des Nitrit-Ions durch Schimmelpilze wurden vom Verfasser experimentelle Beweise bereits früher erbracht[4]). Indem Hagem von der allerdings nicht bewiesenen Voraussetzung ausgeht, daß die Reduktion des Nitrats „nur innerhalb der Pilzzellen, also im Protoplasma, und nie in der Kulturflüssigkeit" stattfindet, kommt er zur Annahme, daß die „Nitratassimilation durch eine Reduktion der Nitrate über Nitrite bis auf Ammoniak stattfindet". Ganz abgesehen, daß sich diese Annahme natur-

[1]) O. Hagem, Untersuchungen über norwegische Mucorineen, II. Videnskabs-Selskabets Skrifter, I. Math. Nat. Kl. **1910**, Nr. 4, S. 25.

[2]) A. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie **3**, 326, **1913**.

[3]) O. Hagem, a. a. O. S. 31.

[4]) A. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie **2**, 58, 1912; **3**, 325, 1913.

gemäß vorerst nur auf die von Hagem allein geprüften Mucor-Arten beziehen kann, lassen sich außer dem Hinweis auf die Unverläßlichkeit des Neßlerschen Reagens für den Ammoniaknachweis in Zuckerlösungen auch die oben angeführten Einwände entgegenstellen[1]), ganz besonders unter Bezugnahme auf die bestehende, eingangs erwähnte ältere Literatur auch die Möglichkeit eines verschiedenen Verhaltens ungleicher Pilze, wodurch weitere experimentelle Untersuchungen nach dieser Richtung hin gewiß berechtigt erscheinen.

Im Jahre 1911 beschäftigt sich Ritter[2]) abermals mit diesem Gegenstande. Eine Nitratreduktion unter Nitritbildung konnte er unter Verwendung des Trommsdorfschen Reagens und Metaphenylendiamin bei Botrytis cinerea, Macrosporium commune, Penicillium glaucum, Cladosporium herbarum, Aspergillus niger, Mucor racemosus und Mucor spinosus nachweisen. Ritter betont auch daß man eine Ansammlung von Nitrit nur in neutralen oder alkalischen Kulturflüssigkeiten erzielen könne. Nebenbei bemerkt, wurde die Feststellung, daß alle von uns untersuchten Pilze Nitrat assimilieren, von mir und später die bestätigende Nachprüfung von mir und Hanisch noch vor Erscheinen der Publikation Ritters erhalten, wobei auch in unseren Versuchen eine gewisse Unregelmäßigkeit und Ungleichmäßigkeit in den Reduktionsvorgängen deutlich zur Beobachtung kam. Für Hefen wurden Nitrate gewöhnlich als ungünstige Stickstoffquelle angesehen, wie dies aus den Befunden A. Mayers[3]) und Laurents[4]) deutlich hervorgeht, welch letzterer (Laurent) insbesondere auf die Reduktion der Nitrate zu Nitriten und die giftige Wirkung der Nitrite auf Hefen hinweist. Gelegentlich seiner Untersuchungen über das Verhalten der Hefen in mineralischen Zuckerlösungen hat der Verfasser[5]) auch Nährlösungen, die Nitrat als alleinige Stickstoffquelle enthielten, zur Züchtung von Hefen herangezogen, wobei er die Beobachtung machte, daß sie sich bei Einimpfung kleiner Hefenmengen zur Ernährung der Hefen ebensowenig gut eignen, wie ammoniumchlorid- oder ammoniumphosphathaltige Zuckerlösungen. Bekanntlich war es Wildiers[6]), der noch unbekannte Stoffe, das sogenannte „Bios", als erforderlich für die Ernährung der Hefe hinstellte und das Versagen der Züchtungsversuche in rein mineralischen Zuckerlösungen (mit Stickstoff in anorganischer Bindung) auf den Mangel dieser Stoffe in solchen Nährlösungen

---

[1]) A. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie 1, 319, 1912; 2, 57, 1912; 3, 321, 1913.

[2]) G. E. Ritter, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 570, 1911.

[3]) Ad. Mayer, Untersuchungen über die alkoholische Gärung, den Stoffbedarf und den Stoffwechsel der Hefepflanze, Heidelberg 1869.

[4]) Laurent, Annal. Soc. belge de Microscopie 14, 29, 1890.

[5]) Al. Kossowicz, Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich 6, 27, 1903.

[6]) Wildiers, La Cellule 18, 318, 1901.

zurückführte[1]). Es ist nun gewiß von Interesse, daß erst kürzlich Kita[2]) einen dem Oryzanin (Suzukis) ähnlichen Stoff in Maltose fand, der die Vermehrung der Hefe wesentlich begünstigt, also auch eine Art „Bios". Über das Verhalten einer Rosahefe zu $NaNO_3$ liegen Untersuchungen von Raciborski[3]) vor. Eine Assimilation von Nitrat konnte Beijerinck[4]) für Saccharomyces acetaethylicus nachweisen, und auch nach Effront[5]) können Nitrate zur Ernährung der Hefe dienen. Eine ältere Angabe von Dubrunfaut[6]) betont gleichfalls die Tauglichkeit der Nitrate zur Ernährung der Hefe. Mit dem Einflusse der Nitrate auf die Gärung der Hefe, vom Standpunkte der Praxis der Gärungsgewerbe aus beschäftigten sich auch Evans[7]) und Briant[8]). Die Nitratreduktion im Hefenpreßsaft unter Stickstoffentbindung ist nach Wroblewski[9]) ein rein chemischer, kein enzymatischer Vorgang[10]).

Eigene Versuche.

Die Versuche wurden mit den nachfolgenden Schimmelpilzen ausgeführt: Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Penicillium glaucum, Penicillium brevicaule*[11]), Isaria farinosa*, Botrytis Bassiana*, Mucor γ Boidin*, ein roten Farbstoff abscheidendes Fusarium (sogen. Fusisporium G)*, Cladosporium herbarum und Phytophthora

[1]) Eine zusammenhängende Darstellung über die Biosfrage gibt der Verfasser in A. Kossowicz, Einführung in die Mykologie der Genußmittel und in die Gärungsphysiologie, Berlin 1911.

[2]) G. Kita, Zeitschr. f. Gärungsphysiol., allgem., landw. u. techn. Mykologie 4, 321, 1914.

[3]) Raciborski, Bull. intern. de l'Acad. des sciences de Cracovie, Class. math. et nat. 1906, Nr. 8, S. 733.

[4]) Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. 11, 68, 1892.

[5]) Effront, Zeitschr. f. Spiritusindustrie 22, 126, 1899.

[6]) Dubrunfaut, Compt. rend. de l'Acad. Paris, 73, 263, 1871.

[7]) Evans, Journ. federated Inst. Brewing 2, 195, 1896.

[8]) Briant, Journ. federated Inst. Brewing 5, 372, 1899.

[9]) Wroblewski, Centralbl. f. Physiol, 13, 284, 1899.

[10]) Vgl. auch P. Thomas, Compt. rend. de l'Acad. 131, 1901. — Pringsheim, diese Zeitschr. 3, 1907. — Kayser, Compt. rend. de l'Acad. 150, 1, 1910. — Fernbach und Lanzenberg, Compt. rend. de l'Acad. 151, 1910. — Lindner und Stockhausen, Wochenschr. f. Brauerei Nr. 40, S. 23 und Biochem. Centralbl. 4. — Lindner, Rülke und Hoffmann, Wochenschr. f. Brauerei Nr. 40, S. 22.

[11]) Die mit Stern bezeichneten Schimmelpilze wurden bisher auf ihr Verhalten zu Nitraten überhaupt nicht geprüft. Das gleiche gilt auch für die hier angeführten Hefen (Sproßpilze).

infestans*. Der letztgenannte Pilz (Phytophthora) wurde nur zu den im Jahre 1910/11 durchgeführten Versuchen herangezogen, da die bez. Reinkultur später zugrunde ging. Zum Vergleich wurden nebenbei auch einige Hefen, und zwar Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten herangezogen, und zwar: Saccharomyces apiculatus*, Saccharomyces cerevisiae I H.*, Saccharomyces ellipsoideus I H.*, Weinhefe Johannisberg II*, Hefe Rasse XII der Berliner Station* und Schizosaccharomyces mellacei[1]).

Die Versuche wurden in kleinen Erlenmeyerkölbchen, die mit 50 ccm Nährlösung versehen und mit Wattepfropfen verschlossen wurden, ausgeführt, und zwar kamen nur Schimmelpilz- und Hefenreinzuchten und sterile Nährflüssigkeiten zur Anwendung. Eine genaue Überprüfung ergab, daß auch während der Untersuchung der Versuchsnährlösungen, in denen Pilz- bzw. Hefenwachstum auftrat und ebenso der nichtbeimpften Kontrollnährlösungen keinerlei Fremdinfektion eingetreten war. Die Sterilisierung der Nährlösungen wurde durch 3 maliges $^1/_2$ stündiges Erhitzen im Kochschen Dampftopf (strömenden Dampf) durch ungefähr $^1/_2$ Stunde in Intervallen von 24 Stunden bewirkt. Die Schimmelpilze wurden zunächst auf in Reagensgläsern befindlichen sterilisierten Kartoffelkeilen, die Hefen auf Würzeagar gezüchtet und von da in die nitrathaltigen Mineralsalznährlösungen übertragen. Die Impfung erfolgte mit einem sterilen Platindraht. Die Versuchstemperatur betrug 16 bis 19°.

Zur Destillation mit Magnesiumoxyd zum quantitativen Nachweis des Ammoniaks wurden je 20 ccm der mycelfreien Nährlösung nach vorhergehendem kräftigen Schütteln und darauffolgendem Stehenlassen der Kultur durch ca. $^1/_2$ Stunde bis zum Verschwinden der Schaumbildung verwendet. Das Ammoniak wurde in $^n/_{100}$-Salzsäure aufgefangen. Die Rücktitration erfolgte mit $^n/_{100}$-Natronlauge, wobei 1 ccm HCl

---

[1]) Die von mir seinerzeit (Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich 6, 27, 1903) gemachte Beobachtung der Bildung eines roten Farbstoffes in mineralischen Zuckerlösungen mit Ammoniumverbindungen als Stickstoffquelle durch Saccharomyces ellipsoideus I H. konnte von mir auch für verschieden zusammengesetzte nitrathaltige Zuckerlösungen bestätigt werden.

1,05 ccm NaOH entsprach. Der Titer der $^n/_{100}$-HCl-Lösung war 1 ccm $^n/_{100}$-HCl = 0,0007425 g HCl = 0,0003467 g NH_3.

Von den vielen gleichartigen und ähnlichen Versuchen, die sich meist entweder nur durch kleine Änderungen in der Zusammensetzung der Nährlösung oder durch die Zwischenzeiträume, in denen die Untersuchung der Nährlösung in bezug auf die Bildung von Nitrit und Ammoniak erfolgte, unterschieden, und die im Prinzip recht übereinstimmende Resultate aufwiesen, soll hier nur eine kleine Auswahl gegeben werden.

A. Versuche mit Schimmelpilzen.

Versuch 1.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm Leitungswasser, 25 g Handelsraffinade, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und 3 g KNO_3. Alle eingangs genannten Schimmelpilze kamen nach Verlauf von einer Woche zu einer kräftigen Entwicklung und Deckenbildung[1]).

Versuch 2.

Die Nährlösung bestand aus 1000 ccm destilliertem Wasser, 25 g Saccharose (reinst), 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 3 g KNO_3, einer Spur $FeCl_3$ und $CaCO_3$. Alle eingangs erwähnten zehn Schimmelpilze zeigten nach 4 bis 10 Tagen gute, kräftige Entwicklung.

Versuch 3.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 25 g reinste Saccharose, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und 3 g KNO_3. Innerhalb 7 Tagen kamen alle 9 Schimmelpilze (Phytophthora infestans wurde zu den weiteren Versuchen wegen Verunglückung der Reinzucht nicht mehr herangezogen) zu kräftiger Entwicklung.

Die erste Prüfung auf NH_3, NO_2 und NO_3 erfolgte nach 7 Tagen, dann wurde daraufhin nach 14, 21, 23, 30 und 34 Tagen geprüft. Nach Verlauf von 30 Tagen war noch in allen Zuchten Nitrat nachzuweisen. Nach 33 Tagen wurde der Versuch abgebrochen: Nitrat war in allen Versuchskölbchen noch anzutreffen, mit Ausnahme der Zuchten von Botrytis Bassiana, Fusarium (Fusisporium) und Penicillium brevicaule, in denen das Nitrat bereits vollkommen verschwunden war. Zum Nachweis des Nitrits wurden Jodzinkstärkelösung und Grießsche Lösung in Anwendung gebracht. Wie aus dem Nachfolgenden hervor-

---

[1]) Bezüglich der Stickstoffverbindungen der Laboratoriumsluft und der Entwicklung der Schimmelpilze in Nitratnährlösung bei Ausschluß der letzteren s. Al. Kossowicz, diese Zeitschr. 64, 82, 1914 und 64, 216, 1914.

geht, ergaben sich zu verschiedenen Untersuchungszeiten auch vielfach Unterschiede bezüglich der einzelnen Reaktionen; es ist daher auch begreiflich, daß eine bloß einmalige Untersuchung solcher Pilzzuchten leicht zu Fehlschlüssen führen kann.

Die Schimmelpilzzuchten zeigten 7 Tage nach der Impfung der Nährlösungen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	schwach	schwach	stark
Asp. glaucus	schwach	sehr schwach	stark
Cladosp. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin.	stark	stark	stark
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	stark	stark	nein
Fusarium	nein	nein	nein
Botrytis Bassiana	schwach	sehr schwach	nein
Mucor Boidin	stark	stark	nein
Kontrolle	nein	nein	nein

Nach 14 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	sehr stark
Asp. glaucus	schwach	sehr schwach	stark
Cladosp. herb.	stark	stark	schwach
Isaria farin.	nein	nein	stark
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	stark	stark	schwach
Fusarium	nein	nein	stark
Botrytis Bas.	stark	schwach	schwach
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein
Kontrolle	nein	nein	nein

Nach 21 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	schwach
Asp. glauc.	nein	nein	schwach
Clad. herb.	stark	stark	stark
Isaria farin.	nein	nein	schwach
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	nein	nein	stark
Fusarium	stark	stark	nein
Botrytis Bas.	stark	stark	stark
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein

Nach 23 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	nein
Asp. glauc.	nein	nein	nein
Clad. herb.	stark	stark	stark
Isaria farin.	nein	nein	schwach
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	nein	nein	schwach
Fusarium	stark	stark	schwach
Botrytis Bas.	stark	stark	stark
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein

Nach 30 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	stark
Asp. glauc.	nein	nein	nein
Clad. herb.	stark	stark	schwach
Isaria farin.	nein	nein	schwach
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	schwach	schwach	schwach
Fusarium	stark	stark	stark
Botrytis Bas.	nein	nein	nein
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein

Nach 33 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	stark
Asp. glauc.	nein	nein	nein
Clad. herb.	stark	stark	nein
Isaria farin.	nein	nein	schwach
Penic. glauc.	nein	nein	stark
Penic. brev.	nein	nein	schwach
Fusarium	stark	stark	stark
Botrytis Bas.	nein	nein	nein
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein

Aus dem Versuch 3 geht hervor, daß von den untersuchten 9 Schimmelpilzen, mit Ausnahme von Penicillium glaucum, alle eine Reduktion des Nitrats zu Nitrit aufwiesen (vgl. Versuch 4). Die Reaktion auf NH_3 nach Neßler gaben alle Pilze außer Mucor γ Boidin. Die Kontrollösung zeigte weder die Nitrit- noch (i. 14 T.) die Neßlersche Reaktion. Die Reaktion nach Neßler ist in diesem Falle, wie schon eingangs erwähnt wurde

für die Ammoniakbildung nicht beweiskräftig, weil ja schon die bloße Hydrolyse der Saccharose diese Reaktion auch veranlassen kann; sie besitzt in diesem Falle nur einigen orientierenden Wert. Wir sehen auch ganz deutlich, daß die einzelnen Pilze sich zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung in bezug auf diese Reaktionen sehr ungleich verhalten.

Versuch 4.

Die Nährlösung bestand aus: 1000 ccm Leitungswasser, 25 g reinster Saccharose, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und 3 g KNO_3. 4 Tage nach der Impfung der Nährlösungen wurden diese zum erstenmal, 11 Tage nach Anlage der Zuchten zum zweitenmal auf NH_3, Nitrit und Nitrat untersucht, worauf die Destillation von 20 ccm der Nährlösung mit MgO und Auffangen des entweichenden Ammoniaks in $^n/_{100}$-HCl erfolgte. Am 7. Versuchstage zeigten alle Pilze gute Entwicklung, am 4. Versuchstage war die Entwicklung der meisten Pilze eine ziemlich gute. Schwach entwickelt waren nur Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum und Mucor γ Boidin (noch keine zusammenhängende Deckenbildung).

Nach 4 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelösung	Reaktion mit Neßlers Reagens	Nitrat mit Diphenylamin u. konz. H_2SO_4
Asp. niger . . .	nein	nein	stark	stark
Asp. glauc. . .	schwach	schwach	stark	stark
Clad. herb. . .	stark	stark	schwach	stark
Isaria far. . . .	schwach	schwach	stark	stark
Penic. glauc. . .	nein	nein	schwach	stark
Penic. brev. . .	stark	stark	schwach	stark
Fusarium . . .	nein	nein	schwach	stark
Botrytis Bas. .	stark	stark	schwach	stark
Mucor Boidin .	schwach	schwach	nein	stark

Nach 11 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelösung	Reaktion mit Neßlers Reagens	Nitrat mit Diphenylamin u. konz. H_2SO_4
Asp. niger . . .	nein	nein	stark	schwach
Asp. glauc. . .	nein	nein	schwach	stark
Clad. herb. . .	stark	stark	schwach	stark
Isaria far. . . .	nein	nein	stark	nein
Penic. glauc. . .	stark	stark	stark	schwach
Penic. brev. . .	nein	nein	schwach	nein
Fusarium . . .	stark	stark	stark	nein
Botrytis Bas. .	nein	nein	nein	nein
Mucor Boidin .	schwach	schwach	nein	stark

Die Destillation der mycelfreien Nährlösungen mit MgO ergab in 20 ccm der Nährlösung:

Aspergillus niger	Differenz von	1,2 ccm	$^{n}/_{100}$-HCl
„ glaucus . . .	„ „	Null	
Cladosporium herbarum	„ „	0,6 ccm	„
Isaria farinosa	„ „	Null	
Penicillium glaucum . .	„ „	18,8 ccm	„
„ brevicaule .	„ „	0,2 „	„
Fusarium	„ „	1,2 „	„
Botrytis Bassiana	„ „	Null	
Mucor γ Boidin	„ „	Null	
Kontrolle	„ „	0,1 „	„

Aus diesem Versuch geht zunächst hervor, daß auch Penicillium glaucum (vgl. Versuch 3) Nitrat zu Nitrit reduziert, daß also (unter Zuziehung des Versuches 3) alle von mir untersuchten Schimmelpilze Nitrat zu Nitrit zu reduzieren vermögen. Mucor γ Boidin zeigte auch in diesem keine Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens. Der Destillationsversuch der 11 Tage alten Pilzkulturen, und zwar der mycelfreien Nährlösungen ergab sichere Bildung von Ammoniak für Aspergillus niger, Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum und Fusarium, zweifelhafte für Penicillium brevicaule.

Versuch 5.

Dieser Versuch wurde mit einer Nährlösung von der Zusammensetzung: 1000 ccm Leitungswasser, 25 g Saccharose reinst, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und 3 g KNO_3 durchgeführt. Nach Verlauf von 3 Tagen zeigten alle 9 Pilze ziemlich gute Entwicklung und Deckenbildung. Mit Ausnahme von Mucor Boidin wiesen alle anderen Pilze die Reaktion nach Neßler auf. Die Destillation am 3. Versuchstage ergab in je 20 ccm der Nährlösungen Differenzen von:

Aspergillus niger	0,8 ccm	$^{n}/_{100}$-HCl
„ glaucus . .	0,3 „	„
Cladosporium herbarum	0,8 „	„
Isaria farinosa	Null	
Penicillium glaucum . .	1,0 „	„
„ brevicaule	0,4 „	„
Fusarium	0,6 „	„
Botrytis Bassiana . . .	Null	
Mucor Boidin	Null	
Kontrolle	Null	

In den Destillaten von Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum, Penicillium brevicaule und Fusarium konnte auch mit Hilfe von Platinchlorid die Anwesenheit von Ammoniak festgestellt werden (vgl. auch Versuch 6).

Versuch 6.

Er entsprach dem Versuch 5 in bezug auf die Nährlösung und erscheint dadurch bemerkenswert, daß auch Isaria farinosa und Botrytis Bassiana, und zwar am 5. Versuchstage sowohl die Reaktion nach Neßler gaben, als auch bei der Destillation Differenzen von 0,8 und 0,2 ccm $^n/_{100}$-HCl zeigten und endlich mit Platinchlorid im Destillat NH_3 nachgewiesen werden konnte. Unter Zuziehung des Versuchs 5 erscheint der Nachweis für die Ammoniakbildung in nitrathaltigen Zuckerlösungen für alle untersuchten Schimmelpilze außer Mucor Boidin erbracht. Eine andere Frage ist es allerdings, ob es sich hier in allen Fällen um die weitere Reduktion des Nitrits oder bloß um die Bildung eines Stoffwechselproduktes, vielleicht aus komplizierteren Stickstoffverbindungen des Pilzkörpers handelt. Erst die später zur Veröffentlichung gelangenden quantitativen Untersuchungen, die in dieser Richtung von mir ausgeführt wurden, werden auch in dieser Beziehung einige weitere Aufschlüsse geben.

Versuch 7.

In diesem Versuch wurde Mannit als Kohlenstoffquelle gewählt. Die Nährlösung bestand aus: 1000 ccm destilliertem Wasser, 5 g KNO_3, 10 g Mannit, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, einer Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Nach einer Woche zeigten alle Schimmelpilze gute Entwicklung.

Nach 9 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelösg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	nein
Asp. glaucus . . .	stark	stark	nein
Clad. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin. . . .	stark	stark	nein
Penic. glauc. . . .	stark	stark	nein
Penic. brevic. . . .	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	nein
Botrytis Bas. . .	schwach	schwach	nein
Mucor Boidin . .	schwach	schwach	nein
Kontrolle	nein	nein	nein

Nach 13 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelösg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger.	ja	ja	nein
Asp. glaucus . . .	ja	ja	nein
Clad. herb.	nein	nein	nein
Isaria farin. . . .	ja	ja	nein
Penic. glauc. . . .	sehr stark	sehr stark	nein
Penic. brevic. . .	ja	ja	nein
Fusarium	ja	ja	nein
Botrytis Bas. . . .	ja	ja	nein
Mucor Boidin . .	ja	ja	nein
Kontrolle	nein	nein	nein

Nach 21 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zink-jodid-Stärkelösg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger.	schwach	schwach	nein
Asp. glauc.	stark	stark	nein
Clad. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin. . . .	stark	stark	nein
Penic. glauc. . . .	stark	stark	nein
Penic. brev. . . .	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	nein
Botrytis Bas. . . .	stark	stark	nein
Mucor Boidin . .	stark	stark	nein

Nach 36 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zink-jodid-Stärkelösg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	nein	nein	nein
Asp. glauc.	schwach	schwach	nein
Clad. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin. . . .	schwach	schwach	stark
Penic. glauc. . . .	stark	stark	stark
Penic. brev. . . .	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	stark
Botrytis Bas. . . .	nein	nein	stark
Mucor Boidin . .	stark	stark	nein
Kontrolle	nein	nein	sehr schwach

Zur Destillation gelangten nur jene Zuchten, die deutliche Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens gezeigt hatten. Die Differenzen betrugen (20 ccm der Nährlösung):

Isaria farinosa	5,0 ccm $^{n}/_{100}$-HCl	
Penicillium glaucum	2,4 „	„
Fusarium	4,8 „	„
Botrytis Bassiana	3,2 „	„
Kontrollkolben (unbeimpft, steril) . .	0,2 „	„

Dieser Versuch zeigt die eigentümliche Erscheinung, daß in den ersten 3 Wochen keiner der Pilze eine Ammoniakbildung aufwies, bzw. daß die Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens innerhalb dieser Zeit stets negativ blieb. Erst nach 36 Versuchstagen ist bei Isaria farinosa, Penicillium glaucum, Fusarium und Botrytis Bassiana eine kräftige Ammoniakbildung festzustellen und konnte auch mit Platinchlorid NH_3 nachgewiesen werden. Dabei war die Entwicklung der Pilze schon nach der ersten Woche eine gute und die Pilze zeigten auch eine befriedigende Deckenbildung. Es ergibt sich hier

also wieder die Berechtigung der Annahme einer direkten Assimilation des Nitrit-Ions durch manche Schimmelpilze, die ich früher[1]) schon für Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum, Penicillium brevicaule und Mucor Boidin angegeben habe. In diesem Falle ließ auch Aspergillus niger eine Ammoniakbildung vollständig vermissen. (Vgl. a. Versuch Nr. 8.) Nitritbildung zeigten im Verlauf des Versuchs alle 9 Pilze.

Versuch 8.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KNO_3, 10 g Mannit, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$. Im Verlauf einer Woche kamen alle 9 Pilze zu einer guten Entwicklung und Deckenbildung.

Nach 5 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	schwach	schwach	nein
Asp. glauc.	stark	stark	nein
Clad. herb.	stark	stark	nein
Isaria farin.	stark	stark	nein
Penic. glauc.	stark	stark	nein
Penic. brev.	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	nein
Botrytis Bas.	schwach	schwach	nein
Mucor Boidin	stark	stark	nein
Kontrollle	nein	nein	nein

Nach 12 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	schwach	schwach	nein
Asp. glauc.	stark	stark	nein
Clad. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin.	stark	schwach	nein
Penic. glauc.	stark	stark	nein
Penic. brev.	stark	schwach	nein
Fusarium	stark	schwach	nein
Botrytis Bas.	schwach	schwach	nein
Mucor Boidin	stark	stark	nein

Ganz gleiche Resultate wurden nach 16, 17 und 19 Versuchstagen erhalten.

---

[1]) Al. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie 2, 55, 1912; 3, 321, 1913.

Nach 21 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zink-jodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	schwach	sehr schwach	nein
Asp. glauc.	schwach	schwach	nein
Clad. herb.	nein	nein	nein
Isaria farin.	stark	stark	nein
Penic. glauc.	stark	stark	nein
Penic. brev.	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	ja
Botrytis Bas.	schwach	schwach	nein
Mucor Boidin	schwach	schwach	nein

Nach 35 Tagen:

Pilzzucht	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zink-jodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Asp. niger	schwach	sehr schwach	nein
Asp. glauc.	schwach	schwach	nein
Clad. herb.	schwach	schwach	nein
Isaria farin.	schwach	schwach	nein
Penic. glauc.	schwach	schwach	ja
Penic. brev.	stark	stark	nein
Fusarium	stark	stark	ja
Botrytis Bas.	stark	schwach	nein
Mucor Boidin	stark	stark	nein
Kontrolle	nein	nein	sehr schwach

Die Nährlösungen der beiden Pilze, die deutliche Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens gezeigt hatten, und zwar von Fusarium und Penicillium glaucum und die unbeimpfte sterile Kontrollnährlösung, ferner zum Vergleich von Isaria farinosa und Penic. brevicaule, wurden der Destillation mit MgO unterworfen, wobei die folgenden Differenzen erhalten wurden:

Fusarium . . . . 4,96 ccm $^n/_{100}$-HCl
Penicillium glaucum . 3,6 " "
Kontrollnährlösung . . . . 0,4 " "
Isaria farinosa . . . . . 0,1 " "
Penicillium brevicaule Null.

Aus dem Versuch 8 geht hervor, daß in allen 9 Pilzzuchten eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit festzustellen war. Eine Ammoniakbildung war erst nach 21 Tagen bei Fusarium und erst nach 35 Tagen bei Penicillium glaucum festzustellen, während die übrigen Pilze die Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens innerhalb einer Versuchsdauer von 35 Tagen nicht gezeigt haben. Wir sehen also (vgl. auch Versuch 7) in

Nährlösungen, die statt Zucker Mannit enthalten, ein vielfach abweichendes Verhalten der Schimmelpilze gegenüber Nitraten.

Versuch 9.

Die Nährlösung bestand aus: 1000 ccm destilliertem Wasser, 25 g Dextrose (reinst), 10 g KNO_3, 2,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und einer Spur $CaCO_3$. Nach 7 Tagen waren alle Pilze gut entwickelt und zeigten kräftige Deckenbildung. Die Destillation mit MgO ergab (20 ccm der mycelfreien Nährlösung) eine Differenz von:

Aspergillus niger	1,6 ccm $^n/_{100}$-HCl
Aspergillus glaucus . .	0,4 „ „
Cladosporium herbarum	0,2 „ „
Isaria farinosa	1,8 „ „
Penicillium glaucum . .	2,6 „ „
Penicillium brevicaule .	0,1 „ „
Fusarium	1,0 „ „
Botrytis Bassiana . . .	1,6 „ „
Mucor Boidin	Null.

Die Ammoniakbildung erscheint in diesem Versuche für Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Isaria farinosa, Penicillium glaucum, Fusarium und Botrytis Bassiana nachgewiesen. Zweifelhaft erscheint sie in diesem Versuche bei Cladosporium herbarum und Penicillium brevicaule. Mucor Boidin zeigte keine Ammoniakbildung.

B. Versuche mit Hefen.

Versuch 1.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung 1000 ccm Leitungswasser, 25 g reinste Saccharose, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 3 g KNO_3.

In den ersten mit dieser Nährlösung und Hefen ausgeführten Versuchen, bei denen mit Hilfe eines Platindrahtes nur sehr geringe Mengen Hefen in die Versuchskolben eingebracht wurden, zeigten die untersuchten Hefen, und zwar Saccharomyces ellipsoideus I H., Saccharomyces cerevisiae I H., Weinhefe Johannisberg II, Hefe Rasse XII der Berliner Station, Saccharomyces apiculatus und Schizosaccharomyces mellacei auch nach Verlauf mehrerer Wochen gar keine Entwicklung, es kam also die vom Verfasser schon so oft wahrgenommene und schon früher eingehend studierte[1])

[1]) Al. Kossowicz, Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich 6, 27, 731, 1903; Einführung in die Mykologie der Genußmittel und in die Gärungsphysiologie, Berlin 1911.

Nichteignung mineralischer Zuckerlösungen mit anorganischen Stickstoffquellen zur Entwicklung geringer Hefemengen zum Ausdruck. Es ergab sich also hier wieder das von Wildiers[1]) aufgeworfene Problem der Notwendigkeit besonderer, noch unbekannter Stoffe für die Entwicklung bzw. Gärung der Hefen, das vor kurzem von Kita[2]) wieder aufgenommen wurde. Auch viel komplizierter zusammengesetzte Nährlösungen erwiesen sich zur Entwicklung kleiner Hefemengen innerhalb eines Zeitraums von mehreren Wochen untauglich, so z. B. auch eine Nährlösung von der Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 50 g Dextrose (reinst), 50 g Saccharose (reinst), 1 g KH_2PO_4, 2 g KNO_3, 2 g $Ca(NO_3)_2$, 1 g $MgSO_4$ und eine Spur $FeSO_4$ und $CaCO_3$. Es wurde daher bei den späteren Versuchen, ebenso wie bei den hier beschriebenen, die Hefe aus der gut entwickelten Würze-Agarzucht (Strichkultur) mit einer kleinen Platinöse in die Nitratnährlösung übertragen. Auch in diesem Falle ging die Entwicklung sehr langsam vor sich und nur bei den erstgenannten vier Hefen kann von einer tatsächlichen Entwicklung gesprochen werden, die schon äußerlich in einer etwas reicheren Depotbildung zum Ausdruck kam, während sie bei Saccharomyces apiculatus und Schizosaccharomyces mellacei so gut wie ganz ausblieb. Bei sehr langer Versuchsdauer (3 bis 6 Monate und darüber) kamen die erstgenannten Hefen allerdings zu reichlicher Entwicklung, doch dürfte dies auf die Aufnahme von Verbindungen aus der Laboratoriumsluft zurückzuführen sein[3]).

In der eingangs angeführten Nährlösung konnte nach Verlauf von 6 Tagen eine deutliche Entwicklung bei Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomyces cerevisiae, Weinhefe Johannisberg II und Hefe Rasse XII (bei Einimpfung einer Platinöse Hefe) wahrgenommen werden. Der Befund bezüglich der Nitritbildung und der Reaktion mit Neßlers Reagens war folgender:

---

[1]) Wildiers, La Cellule 18, 313, 1901. — Amand, La Cellule 20, 225, 1902; 21, 329, 1904. — Devloo, La Cellule 23, 361, 1906. — Ide, Centralbl. f. Bakt. 2. Abt. 18, 193, 1907.

[2]) Kita, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, allgem., landw. u. techn. Mykologie 4, 321, 1914.

[3]) Al. Kossowicz, diese Zeitschr. 64, 82, 1914.

Hefe	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Sacch. ellips.	sehr schwach	nein	ja
Sacch. cerev. . . .	sehr schwach	nein	ja
Rasse XII	sehr schwach	nein	ja
Johannisberg II . .	sehr schwach	nein	ja
Sacch. apic.	nein	nein	nein
Schizosacch. mell. .	nein	nein	nein
Kontrolle	nein	nein	nein

In allen Versuchskolben war noch Nitrat vorhanden. Nitritbildung konnte nur mit dem sehr empfindlichen Grießschen Reagens nachgewiesen werden und die Reaktion fiel sehr schwach aus, es ist also überhaupt zweifelhaft, ob eine Nitritbildung stattgefunden hat. Die vier besser entwickelten Hefen zeigten die Reaktion nach Neßler, die aber auch auf die Spaltung der Saccharose usw. zurückgeführt werden kann, nicht ohne weiteres als Ammoniakbildung gedeutet werden darf.

Nach 21, 28, 40 Tagen wurde dasselbe Resultat erhalten wie nach 6 Tagen, d. h. eine deutliche Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens und ein Versagen der Nitritreaktion mit der Zinkjodid-Stärkelösung.

Nach 3 Monaten:

Hefe	Nitrit nach Grieß	Nitrit mit Zinkjodid-Stärkelsg.	Reaktion mit Neßlers Reagens
Sacch. ellips.	nein	nein	ja
Sacch. cerev.	nein	nein	ja
Rasse XII	nein	nein	ja
Johannisberg II . .	nein	nein	ja
Sacch. apic.	schwach	nein	nein
Schizosacch. mell. .	nein	nein	ja
Kontrolle	nein	nein	schwach

Nach 3 Monaten wurden die Hefen der Destillation mit gebrannter Magnesia unterworfen, wobei 20 ccm der Nährlösung zur Untersuchung kamen. Es wurden folgende Differenzen erhalten:

Kontrolle	0,2 ccm $^n/_{100}$-HCl
Sacch. ellipsoideus . .	0,5 „ „
Sacch. cerevisiae . . .	0,4 „ „
Hefe Rasse XII	0,6 „ „
Hefe Johannisberg II . .	Null
Sacch. apiculatus . . .	0,6 „ „
Schizosacch. mellacei .	0,6 „ „

Vor der Destillation wurden auch Überimpfungen der Hefe aus den Versuchskölbchen in Würzeagar ausgeführt. Alle Hefen gingen auf diesem Nährboden an. Nach 3 monatlicher Versuchsdauer war also kein Absterben der Hefen in der mineralischen Zuckerlösung erfolgt. In einem zweiten Falle konnte in einer Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung auch ein Überleben der genannten Hefen nach einer Versuchsdauer von 5 Monaten festgestellt werden.

Versuch 2.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 50 g Dextrose, 50 g Saccharose, 1 g KH_2PO_4, 2 g KNO_3, 2 g $Ca(NO_3)_2$, 1 g $MgSO_4$, eine Spur $FeSO_4$. Die Untersuchung auf Nitrit und die Reaktion mit Neßlers Reagens wurden nach 3, 4, 5, 7, 9, 11 und 18 Tagen ausgeführt. Die Nitritreaktion mit der Zinkjodid-Stärkelösung blieb stets aus, die Reaktion mit Neßlers Reagens kam auch in der Kontrolllösung (Dextrose!) zum Ausdruck.

Die Destillation nach 18 Tagen ergab eine Differenz von:

Sacch. ellipsoideus . .	0,5 ccm $^n/_{100}$-HCl
Sacch. cerevisiae . . .	0,4 " "
Hefe Rasse XII	0,6 " "
Weinhefe Johannisberg II .	0,5 " "
Sacch. apiculatus . . .	Null
Schizosacch. mellacei .	0,5 " "

Von Interesse erscheint der Umstand, daß eine deutliche Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch Hefen weder in den hier beschriebenen noch in anderen, mit ähnlich zusammengesetzten Nährlösungen ausgeführten Untersuchungen wahrgenommen werden konnte. Im allgemeinen erscheint in Übereinstimmung mit der Feststellung anderer Forscher Nitrat als eine wenig günstige Stickstoffquelle für Hefen, während es von Schimmelpilzen sehr gut ausgenützt wird.

Beitrag zur physikalischen Chemie der Vitalfärbung.

Von

Rudolf Höber.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 31. Juli 1914.)

Durch die auf den folgenden Seiten mitgeteilten Versuche sollte die Frage beantwortet werden, ob bei wässerigen Farblösungen ein Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung, Giftigkeit und vitalem Färbevermögen vorhanden ist. Ein solcher Zusammenhang lag nicht bloß deswegen im Bereich der Möglichkeit, weil gelegentlich beobachtet war, daß auffallend giftige basische Farbstoffe, wie Malachitgrün, Methylviolett und Nachtblau, die Oberflächenspannung des Wassers stark erniedrigen, während relativ harmlose Farbbasen, wie Toluidinblau oder Neutralrot, dies nicht tun. Sondern es kam hinzu, daß in der Narkosetheorie von Traube für eine andere Klasse von Giftstoffen, eben für die Narkotica, dieser Zusammenhang zwischen Oberflächenaktivität und Wirkung dargelegt war. Im speziellen könnte man sich daher für die Farben wohl vorstellen, daß sie im Innern von Zellen etwa dadurch zu Giften werden, daß sie an die inneren Strukturflächen der Zellen absorbiert werden, dort die an der Struktur angehefteten intracellulären Fermente zudecken und auf die Weise den Stoffwechsel stören[1]). Dr. Kozawa hat nun unter meiner Leitung einige Versuche über die Existenz des genannten Zusammenhangs ausgeführt. Dabei wurden auch einige Beobachtungen gemacht, die für die Theorie der Vitalfärbung von Bedeutung sind.

---

[1]) Siehe dazu O. Warburg, Ergebn. d. Physiol. **1914**, 253.

In den Versuchen wurden folgende Farbstoffe verwendet:

1. Basische Farbstoffe.

1. Chrysoidin G (Bayer)
2. Vesuvin B (Bad. Anilinfabr.)
3. Malachitgrün Kryst. extra (Höchster Farbw.)
4. Dahlia (Grübler)
5. Methylviolett B extra (Kahlbaum)
6. Krystallviolett. Chlorid
7. Methylgrün Kryst. I (Bayer)
8. Rhodamin B extra (Ges. f. chem. Industr., Basel)
9. Methylenblau Ia (Höchster Farbw.)
10. Methylengrün (Merck)
11. Toluidinblau (Grübler).
12. Neutralviolett (Schuchardt)
13. Thionin pur. (Grübler)
14. Brillantcresylblau (Grübler)
15. Neutralrot (Grübler)
16. Safranin (Grübler)

2. Saure Farbstoffe.

1. Wollviolett S (Bad. Anilinfabr.)
2. Azorubin A (Cassella)
3. Naphtholblauschwarz (Cassella)
4. Kongorot (Grübler)
5. Trisulfonblau B (Sandoz)
6. Afridolblau (Bayer)
7. Trypanrot (Grübler)
8. Oxaminblau 3 R (Bad. Anilinfab.)
9. Benzolblau 2 B rein (Bayer)
10. Trypanblau (Grübler)
11. Benzopurpurin 6 B (Bayer)
12. Azoblau rein (Bayer)
13. Diaminreinblau (Cassella)
14. Hessisch Purpur N (Bayer)
15. Diamingrün B (Cassella)
16. Anilingrün Brillant (Merck)
17. Guineagrün (Kahlbaum)
18. Lichtgrün F S (Grübler)
19. Cyanol extra (Cassella)
20. Patentblau V (Höchster Farbw.)
21. Patentblau A (Höchster Farbw.)
22. Bayrischblau (Kahlbaum)
23. Rotviolett 5 R S (Bad. Anilinfab.)
24. Säureviolett (Kahlbaum)
25. Eriocyanin (Geigy)
26. Setopalin (Geigy)
27. Anilinblau wasserlösl. (Grübler)
28. Naphthalingrün V (Höchster Farbw.)
29. Rose bengale (Sandoz)
30. Phloxin jodfrei (Bad. Anilinfabr.)
31. Echtsäurephloxin (Höchster Farbw.)
32. Anilingrün Naphthol B (Merck)
33. Berliner Blau 1a leichtlöslich (Grübler)
34. Carmin
35. Molybdänblau

I. Die relative Oberflächenspannung der Farblösungen.

Die relative Oberflächenspannung wurde mit einem Traube-schen Stalagmometer an den 1,0 %igen wässerigen Lösungen gemessen. Gegen die Brauchbarkeit der Ergebnisse ist eventuell einzuwenden, daß Verunreinigungen, die den im Handel befindlichen technischen Farbstoffen oft anhaften, in unkontrollierbarer Weise mitgewirkt haben. Die folgende Tabelle gibt die gefundenen Tropfenzahlen an:

1. Basische Farbstoffe.

Rhodamin B extra	21,1	Brillantcresylblau	18,4
Malachitgrün	20,9	Neutralviolett	18,2
Methylviolett	20,7	Methylengrün	18,0
Krystallviolett	20,6	Safranin	17,9
Chrysoidin G	20,6	Neutralrot	17,8
Methylgrün	20,3	Toluidinblau	17,6
Dahlia	20,2	Thionin	17,5
Vesuvin B	18,6	Methylenblau	17,5

2. Saure Farbstoffe.

Patentblau A	25,9	Oxaminblau	17,8
Patentblau V	22,3	Diamingrün	17,8
Anilingrün Brillant	21,8	Rotviolett	17,7
Säureviolett	21,5	Afridolblau	17,7
Guineagrün	20,9	Phloxin	17,7
Echtsäurephloxin	20,6	Diaminreinblau	17,6
Cyanol extra	20,3	Bayrischblau	17,6
Wollviolett S (nicht ganz gelöst)	20,3	Benzoblau	17,6
		Trisulfonblau	17,6
Eriocyanin	19,7	Trypanrot	17,6
Naphtholblauschwarz	18,5	Trypanblau	17,5
Naphthalingrün	18,4	Säurefuchsin	17,5
Azorubin	18,2	Anilingrün Naphthol B	17,5
Lichtgrün F S	18,1	Kongorot	17,5
Anilinblau	18,0	Berliner Blau	17,5
Rose bengale	17,9	Molybdänblau (nicht ganz gelöst)	17,5
Azoblau	17,9		

II. Giftwirkung und Oberflächenaktivität bei den basischen Farbstoffen.

Die Giftwirkung wurde erstens an Kaulquappen in der Weise bestimmt, daß eine Anzahl von Tieren in je 300 ccm der 0,01 $^0/_0$igen Farblösungen gebracht und dann gewartet wurde, bis Bewegungslosigkeit eintrat. Dies geschah bei manchen Farbstoffen, wie etwa Malachitgrün oder Krystallviolett, schon nach 20 bis 30 Minuten, während bei anderen, wie z. B. dem Rhodamin, die Beweglichkeit noch nach 24 Stunden erhalten war. Mehrfache Prüfung ergab etwa folgende Reihenfolge der Giftigkeit:

Malachitgrün;
Methylviolett, Krystallviolett, Chrysoidin;
Methylgrün, Neutralviolett, Dahlia;
Methylengrün, Brillantcresylblau, Thionin;

Toluidinblau;
Vesuvin, Neutralrot;
Safranin, Methylenblau, Rhodamin.

Diese Befunde decken sich ungefähr mit Angaben, die vor längerer Zeit Fischel[1]) über die Giftigkeit der Farbbasen für Larven vom Frosch, Salamander und Siredon gemacht hat.

Die Giftigkeit wurde zweitens an Opalinen aus dem Enddarm von Rana esculenta geprüft. Dafür wurden die Infusorien mit einer Platinöse aus den Schleimhautfalten des Darms herausgeholt und in feuchte Kammern übertragen, die in einer Versuchsserie 0,1 %, in einer zweiten 0,01 % Farbstoff in Leitungswasser enthielten. Die Giftwirkung konnte hier einesteils am Nachlassen der Flimmerbewegung bis zu ihrem Erlöschen, andernteils an auffallenden Strukturänderungen, bestehend im Ausstoßen größerer oder kleinerer Vakuolen, gemessen werden. So ergab sich für die Giftigkeit etwa folgende Reihenfolge:

Malachitgrün;
Neutralviolett, Neutralrot, Krystallviolett, Methylviolett, Methylengrün;
Dahlia, Methylenblau, Toluidinblau, Thionin;
Brillantcresylblau;
Rhodamin, Vesuvin, Methylgrün, Chrysoidin, Safranin.

Es stellte sich also für Amphibienlarven und Infusorien eine verschiedene Abstufung in der Giftigkeit der Farbstoffe heraus.

Schon daraus, aber noch mehr aus dem Vergleich dieser Reihenfolge mit der Tabelle für die Stalagmometerwerte folgt, daß der als möglich angenommene Parallelismus zwischen Oberflächenaktivität und Giftigkeit bei den Farbstoffen nicht existiert. Denn entnehmen wir etwa der Tabelle diejenigen Farbstoffe, deren Lösungen eine große Tropfenzahl geben, so sind dies Malachitgrün, Methylviolett, Krystallviolett, Dahlia, Methylgrün, Chrysoidin und Rhodamin. Davon sind Malachitgrün, Methylviolett und Krystallviolett sehr giftig, Dahlia von mittlerer Giftigkeit, Methylgrün und Chrysoidin für Froschlarven recht giftig, für Infusorien dagegen relativ unschädlich,

[1]) Fischel, Anatom. Hefte, Herausgegeb. von Merkel und Bonnet, 1901, Heft 52/53.

und Rhodamin endlich in jedem Fall wenig wirksam. Andererseits geben eine kleine Tropfenzahl u. a. Safranin, Neutralrot und Neutralviolett; davon sind Neutralrot und Neutralviolett für die Opalinen giftig, Safranin nur wenig schädlich.

Es sei gleich eingeschaltet, daß die gemessenen Oberflächenaktivitäten gegen die Grenzfläche Wasser—Luft natürlich nicht mit den Oberflächenaktivitäten gegen die Grenzfläche Wasser—Protoplasma der Richtung nach übereinzustimmen brauchen. Immerhin kann man sich darauf berufen, daß bei den Narkotica die toxische Aktivität den Stalagmometerwerten im allgemeinen parallel läuft.

Es wurde aber doch auch noch direkt nach einem Anhaltspunkt für die Größe der Oberflächenaktivität gegen die Grenzfläche Wasser—Zelloberfläche gesucht. Nach den Untersuchungen von Perrin und Freundlich kann man annehmen, daß die Kationen der basischen Farbstoffe die normalerweise negative Ladung von Zellen in um so geringerer Konzentration neutralisieren werden, je adsorbierbarer sie sind. Dem entprechend wurde diejenige Farbstoffkonzentration bestimmt, bei der Blutkörperchen, gleich nach Übertragung in die Farbstofflösungen, in dem von mir[1]) angegebenen Kataphoreseapparat positive Ladung aufweisen. Die Ergebnisse waren die folgenden:

Farbstoff	Farbstoffkonzentration %	Elektrische Ladung der Blutkörperchen	Tropfenzahl in 1,0%
Rhodamin	0,02	+	21
Malachitgrün . . .	0,05	+	21
Methylviolett . . .	0,05	+	21
Vesuvin	0,05	+	19
Brillantcresylblau .	0,05	+	18
Neutralrot	0,05	+	18
Chrysoidin	0,1	+	21
Neutralviolett . . .	0,1	+	18
Methylenblau . . .	0,1—0,2	—	17
Thionin	0,1—0,2	—	17
Toluidinblau . . .	0,1—0,2	—	18
Krystallviolett . . .	0,1—0,2	—	21
Safranin	0,1—0,2	—	18
Methylgrün	0,1—0,2	—	20
Methylengrün . . .	0,1—0,2	—	18
Dahlia	0,1—0,2	—	20

[1]) Siehe Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 101, 607, 1914.

Die Tabelle lehrt, daß Tropfenzahl und Umladefähigkeit einander gar nicht zugeordnet sind; aber auch Giftigkeit und Umladefähigkeit gehen einander nicht parallel[1]).

III. Giftwirkung und Oberflächenaktivität bei den sauren Farbstoffen.

Auch die Giftwirkung der Säurefarbstoffe wurde in der geschilderten Weise an den beiden Objekten der Froschlarven und der Infusorien aus dem Froschenddarm geprüft. Die Froschlarven kamen in Lösungen von 0,01 %, 0,1 % und 0,5 %, die Infusorien in Lösungen von 0,01 % und 0,1 %; als Lösungsmittel wurde jedesmal Leitungswasser benutzt. Wie zu erwarten war, erwiesen sich die Säurefarbstoffe im allgemeinen als recht indifferent. Stärker giftig war unter den geprüften Farben nur Anilingrün Brillant, etwas weniger giftig Hessisch Purpur, Rose bengale und der anorganische Farbstoff Molybdänblau, mäßig giftig auch Phloxin und Patentblau A; nicht ganz harmlos waren endlich für die Kaulquappen auch Azorubin, Naphtholblauschwarz, Trypanrot, Diaminreinblau, Patentblau V, Benzoblau, Wollviolett, Trypanblau, Afridolblau, Säurefuchsin, Kongorot und Benzopurpurin.

Ein Zusammenhang mit der durch Tropfenzählung bestimmten Oberflächenaktivität wird also auch hier vermißt.

---

[1]) In einem Aufsatz von I. Traube (Deutsche med. Wochenschr. 1912, Nr. 31) findet sich der folgende Satz: „Je nachdem ob ein Protozoon oder Bacillus im elektrischen Felde nach der Kathode oder Anode wandert, verhält er sich mehr kationisch oder anionisch, und je nachdem werden in erster Linie anionische oder kationische Arzneimittel in Betracht kommen. So wandern die Trypanosomen nach der Kathode, dementsprechend werden in erster Linie das anionische Atoxyl und der saure Farbstoff Trypanrot als wirkungsvoll bezeichnet, bei der tertianen Form der Malaria verwendet man demgegenüber in erster Linie basische Arzneimittel: Chinin, Salvarsan und Methylenblau. Die Spirochaeta pallida wandert überhaupt nicht, hier kommen demnach sowohl anionische (I, Hg) wie kationische Arzneimittel (Salvarsan) in Betracht". — Wir haben uns vergeblich bemüht, die auffallende Angabe von Traube, daß die Trypanosomen positive Ladung führen, zu bestätigen. Wir haben sowohl Nagana wie Dourine auf weißen Mäusen gezüchtet und beide auf ihre Kataphoreserichtung untersucht; beide gehen zur Anode. Die von Traube in dem genannten Aufsatz entwickelte Anschauung vom „elektrophysikalischen Dualismus der Arzneimittelwirkung" schießt gewiß weit über das Ziel.

Denn unter den ungiftigen Farben finden wir z. B. ebensowohl Cyanol und Guineagrün mit der Tropfenzahl 20,5, wie Naphthalingrün mit der Tropfenzahl 18,4 oder Rotviolett mit der Tropfenzahl 17,7.

IV. Färbekraft und Oberflächenaktivität.

a) Basische Farbstoffe. Es ist bekannt, daß, im Gegensatz zu den sauren Farbstoffen, die basischen Farbstoffe die lebenden Zellen im allgemeinen rasch färben. Es ist aber auch bekannt, daß die Intensität der angenommenen basischen Färbung von Farbstoff zu Farbstoff recht stark variiert. So färben von den hier erwähnten Farben Rhodamin, Safranin, Methylgrün im allgemeinen wenig etwa im Verhältnis zu Neutralrot oder Methylviolett. Eine Beziehung zur Oberflächenaktivität besteht also augenscheinlich nicht. Eine solche ließ sich auch bei den Färbungsversuchen an den Opalinen des Froschdarms nicht feststellen; die gefundene Reihenfolge der Färbbarkeit war etwa:

Neutralviolett, Neutralrot, Krystallviolett, Methylviolett, Chrysoidin, Malachitgrün;
Brillantcresylblau, Methylenblau, Toluidinblau;
Rhodamin;
Dahlia, Methylengrün, Vesuvin, Methylgrün;
Safranin, Thionin.

b) Saure Farbstoffe. Wir gingen von vornherein mit der Erwartung an die Versuche über die Färbung mit den Säurefarbstoffen, so gut wie nichts von Färbung zu erhalten. Beim höheren Tier färben sich ja, soweit bis jetzt bekannt ist, intra vitam mit den Säurefarbstoffen nur ganz wenige Zellsorten, nämlich gewisse Epithelien der Niere, die Goldmannschen „Pyrrolzellen", und allenfalls gelegentlich Epithelien der Speicheldrüsen. Nicht anders verhalten sich die Froschlarven; wie schon Fischel (l. c.) angab, findet man bei ihnen allenfalls eine leichte diffuse Färbung einzelner Gewebe; es mag nicht ausgeschlossen sein, daß sich hier auch so unscheinbare Zellen, wie manche Sorten der von Goldmann als Pyrrolzellen zusammengefaßten Zellen des Interstitiums distinkter färben; das Gros der Zellen bleibt jedenfalls farblos.

Die Voraussetzung, das gleiche bei den Infusorien zu finden, traf jedoch nicht zu; vielmehr zeigte es sich, daß diese jede beliebige Farbe, soweit sie nicht giftig ist, in sich aufnehmen. Am besten ist dies zu beobachten, wenn man Fröschen eine Messerspitze voll trockener Farbe ins Maul bringt und dann nach 24 bis 48 Stunden die Opalinen des Enddarms in Ringerlösung untersucht; man findet diese dann oft prachtvoll intensiv und gleichmäßig durchgefärbt in normaler Lebhaftigkeit in der farblosen Lösung umherschwimmen. Die Tiefe der so zu erzielenden Färbung ist recht verschieden; die intensivsten Färbungen sahen wir bei Guineagrün, Eriocyanin, Lichtgrün, Cyanol, Patentblau V, Bayrischblau, Trisulfonblau, Säurefuchsin, Anilingrün Naphthol B, Diamingrün, Trypanblau, Diaminblau und Säureviolett.

Nächstdem kamen an Färbevermögen:

Patentblau A, Azorubin, Benzoblau, Setopalin;

Rotviolett, Kongorot, Berlinerblau, Anilinblau, Rose bengale;

Trypanrot, Afridolblau, Benzopurpurin, Azoblau, Echtsäurephloxin, Karmin;

Naphtholblauschwarz, Oxaminblau, Molybdänblau, Phloxin, Chinesische Tusche, Hessisch Purpur.

Ein Zusammenhang mit der Oberflächenaktivität der Farben mangelt also auch hier wieder.

Die Tatsache, daß tierische Zellen mit jedem beliebigen Säurefarbstoff vital gefärbt werden können[1]), ist bisher ohne Analogie. Es wurde zwar vorher erwähnt, daß z. B. gewisse Nierenepithelien saure Farben annehmen, doch habe ich gezeigt[2]), daß dies nicht für alle Säurefarben gilt, sondern daß bestimmte Farben, die sämtlich zur Gruppe der Suspensionskolloide gehören, nicht aufgenommen werden; ähnliches scheint nach Schulemann[3]) für manche der Pyrrolzellen zu gelten. Auch für die Pflanzenzellen, die weit allgemeiner als tierische Zellen befähigt sind, sich mit sauren Farbstoffen zu tingieren,

---

[1]) Keine deutliche Färbung erfolgte in der Lösung von Wollviolett; doch hat dies seine besonderen Gründe: siehe Höber, diese Zeitschr. 20, 73, 1909. Ferner mißlang der Versuch einer Färbung mit Molybdänblau, weil die Tiere zu rasch starben.

[2]) Höber, diese Zeitschr. 20, 56, 1909. — Höber und Nast, ebenda.

[3]) Schulemann, Arch. f. Pharmazie 250, 252, 1912.

ist dem Aufnahmevermögen nach den Untersuchungen von E. Küster[1]) und von Ruhland[2]) in einem gewissen Grad von kolloider Beschaffenheit eine Grenze gezogen. Hier gilt das nicht; vielmehr begegnen wir unter den die Opalinen am stärksten tingierenden Farben neben den leicht diffusiblen Lichtgrün, Cyanol, Naphthalingrün, Patentblau V, Eriocyanin indiffusiblen Farben, wie Diaminreinblau, Trisulfonblau Trypanblau, Diamingrün, Bayrischblau, die teils der Gruppe der Suspensionskolloide angehören, teils mehr den hydrophilen Kolloiden ähneln[3]).

Man wird sich fragen, worin diese Eigenart der Opalinen begründet sein mag. Meiner Meinung nach ist es vielleicht am angemessensten, zu sagen: sie fressen die Farbe. Der Begriff „Fressen" weckt zunächst wohl die Vorstellung von einem Import durch eine Mundöffnung, und viele Infusorien sind auch im Besitz einer solchen und nehmen durch sie allerlei feste Partikeln auf, die durch ihre Pellicula nicht eindringen könnten. Wir haben bei den eine Mundöffnung besitzenden Balantidien und Nyctotheren, die neben den Opalinen im Froschdarm vorkommen, auch beobachtet, daß sie sämtliche genannte Farben aufnehmen; jedenfalls färben sich die Vakuolen in ihnen mit der Zeit intensiv, während das Protoplasma gewöhnlich farblos bleibt. Die Opalinen besitzen aber keine Pellicula und keine Mundöffnung und nehmen darum wohl die Nahrung durch beliebige Stellen ihrer Körperoberfläche auf, so wie es die Amöben, die im Mangel einer Mundöffnung den Opalinen ähnlich sind, ja auch tun. Und diese Nahrungsaufnahme der Amöben, die oft in Form des Imports von Algenfäden, Karmin- oder Tuschekörnchen beschrieben worden ist, wird ebenfalls als Fressen bezeichnet, die Amöben des Metazoenkörpers, die Leukocyten, heißen direkt „Freßzellen". Ob Amöben freilich auch „gelöste" Farbstoffe „fressen", ist bisher nicht untersucht. Jedenfalls liegt aber wohl kein Grund vor, anzunehmen, daß, wenn Amöben, Leukocyten und Infusorien gröbere Partikeln aufnehmen können, ihr Importvermögen nun mit einem Male nach einer unteren Grenze in der Größe der Partikeln beschränkt sein sollte. Es

[1]) E. Küster, Jahrb. f. wissenschaftl. Botan. 50, 261, 1911.
[2]) Ruhland, Jahrb. f. wissenschaftl. Botan. 51, 376, 1912.
[3]) Siehe dazu Höber l. c.

ist in dieser Beziehung von einigem Interesse, daß manche interstitielle Zellen, wie die Kupfferschen Sternzellen, die wie Leukocyten sich mit Bakterien zu beladen vermögen, nach den neueren Untersuchungen von Voigt[1]) auch Collargol in sich speichern. Die Kupfferschen Sternzellen gehören aber mit zu den Pyrrolzellen von Goldmann, die sich mit den Nierenepithelien durch ihr hohes Importvermögen für Säurefarbstoffe vor den übrigen Zellen der Tiere auszeichnen. Vielleicht beruht also die vitale Färbbarkeit mit Säurefarbstoffen bei den Tieren öfter auf einer Art Fressen, d. h. auf einem Modus von Funktionieren der Zelloberfläche, der dem Umfließen der geformten Nahrung bei den Amöben vergleichbar ist, und das wäre physikochemisch ganz etwas anderes, als wenn durch einen Diffusions- oder Lösungsprozeß ein Farbstoff molekulardispers aufgeteilt ins Zellinnere vordringt. Vielleicht gewinnen auf diese Weise auch die von mir aufgestellten Begriffe der „physikalischen“ und der „physiologischen Permeabilität“ der Zellen inhaltlich eine neue Bedeutung[2]).

Es dürfte auffallen, daß über die Färbbarkeit von Opalinen mit Säurefarbstoffen bisher keine Angaben existieren. Auch im Kieler Institut sind schon öfter Opalinen in mit sauren Farbstoffen gefärbten Lösungen beobachtet worden, ohne daß etwas von Anfärbung zu bemerken war. Unsere Färbungen gelangen zunächst durch Verfüttern der Farbe. Man könnte deshalb meinen, daß im Darm besondere Bedingungen, etwa die Reaktion des Darminhalts im Sinne der von Bethe[3]) entwickelten Anschauung über Vitalfärbung, die Färbung herbeiführen. Es gelang aber auch, die Opalinen in Ringerlösung vital zu färben. Man muß nur starke Farbkonzentrationen anwenden und genügend lange warten. Auch im Enddarm sind ja die Opalinen großen Massen von Farbe, die dort nach der Fütterung liegen bleiben, exponiert, ohne daß sie irgendwie beschädigt werden; dementsprechend wurde in kleinen Schalen vergleichsweise zu Darminhalt und zu einigen Tropfen mit Opalinen geimpfter Ringerlösung Farbstoff in Substanz zugesetzt

[1]) J. Voigt, Deutsche med. Wochenschr. 1914, Nr. 10.

[2]) Siehe dazu: Höber, Physikal. Chemie der Zellen und der Gewebe. 4. Aufl. 1914. Kap. 8.

[3]) Bethe, Bull. de l'Institut océanograph. Monaco Nr. 284, 1914.

und dann bis zur Beobachtung 6 bis 24 Stunden gewartet. Im allgemeinen gelingt unter diesen Umständen die Vitalfärbung im Darminhalt zwar leichter, aber oft ist sie auch unter beiden Bedingungen gleich gut, wie z. B. für Cyanol, Afridolblau, Kongorot, Bayrischblau konstatiert werden konnte; auch im Blutserum vom Rind nahmen die Opalinen Cyanol und Azoblau ganz gut auf. In einem Tropfen gefärbter Ringerlösung, auf einem eingeschliffenen Objektträger unter Deckglas eingeschlossen, gingen die Opalinen jedoch fast immer innerhalb von 3 Stunden ungefärbt zugrunde.

Zusammenfassung.

1. Vitales Färbevermögen, Giftigkeit, Umladefähigkeit und Tropfenzahl der wässerigen Lösungen saurer und basischer Farbstoffe hängen nicht miteinander zusammen.

2. Opalinen werden durch beliebige basische oder saure Farbstoffe vital gefärbt.

Die zweite Dissoziationskonstante der Phosphorsäure.

Von

L. Michaelis und T. Garmendia.

(Eingegangen am 2. August 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Von den drei Dissoziationskonstanten der Phosphorsäure ist die erste und die dritte biologisch ohne Interesse, die zweite dagegen eine der biologisch wichtigsten Naturkonstanten.

Die Konstanten der Phosphorsäure wurden von Abbott und Bray[1]) folgendermaßen bestimmt:

$$K_1 = 1{,}1 \cdot 10^{-2}$$
$$K_2 = 1{,}95 \cdot 10^{-7}$$
$$K_3 = 3{,}6 \cdot 10^{-13}$$

Sie berechnen diese Konstanten aus Leitfähigkeitsmessungen der Säure und ihrer verschiedenen Alkalisalze. Wie wir schon wiederholt zeigten, besitzen wir aber in der elektrometrischen Bestimmung der H-Ionenkonzentration in Gemischen der Säuren mit ihren Salzen bzw. in Gemischen von Salzen der verschiedenen Ionisationsstufen eine Methode zur Messung der Dissoziationskonstanten, die der Leitfähigkeitsmethode oft weit überlegen ist. Insbesondere für mehrbasische Säuren enthält die Leitfähigkeitsmethode infolge der Notwendigkeit mehrerer und nicht immer ganz sicherer Korrekturen in der Berechnung eine erhöhte Unsicherheit.

Bei der ungemeinen Wichtigkeit dieser Zahlen schien es uns erwünscht, wenigstens die zweite Dissoziationskonstante

---

[1]) G. A. Abbott und W. C. Bray, The Ionization Relations of Ortho- and Pyrophosphoric Acids and their Salts. Journ. Amer. Chem. Soc. 31, 729, 1909; s. S. 760.

zu revidieren und gleichzeitig über die Dissoziationsgrade der verschiedenen Natronsalze das Notwendige nachzutragen. Wir verwendeten wiederum die elektrometrische Methode. Die Ausgangslösungen stellten die nach der Vorschrift von Sörensen hergestellten und vor Kohlensäure geschützt aufbewahrten Lösungen von $^m/_{15}$ primärem Kaliumphosphat und $^m/_{15}$ sekundärem Natriumphosphat. Diese wurden zu gleichen Teilen gemischt und in ihnen die $[H^{\cdot}]$ elektrometrisch bestimmt. Nach der Theorie ist

$$[H^{\cdot}] = k_2 \cdot \frac{[H_2PO_3']}{[HPO_3'']}.$$

Nun können wir $[H_2PO_3'] = \delta_1 \cdot [KH_2PO_4]$ setzen, und $[HPO_3''] = \delta_2 \cdot [Na_2HPO_4]$, wo δ_1 und δ_2 dem den betreffenden Bedingungen entsprechenden elektrolytischen Dissoziationsgrade dieser Salze sind, so daß

$$k_2 = [H^{\cdot}] \cdot \frac{\delta_2}{\delta_1},$$

vorausgesetzt, daß wir die beiden Phosphate in äquimolekularen Mengen gemischt haben. Die besondere Schwierigkeit der Aufgabe liegt nun in einer genauen Bestimmung dieser Dissoziationsgrade der beiden Salze. Können wir auch die des reinen primären Kaliumphosphats aus Leitfähigkeitsmessungen gut berechnen, so wird durch die Vermischung mit einem Natriumsalz hier eine nicht gut berechenbare Änderung bewirkt; und vor allem ist der Dissoziationsgrad des sekundären Phosphats als eines stufenweise dissoziierenden ternären Elektrolyten nicht genau genug aus Leitfähigkeitsdaten zu berechnen. Nur soviel wissen wir, daß δ_2 auf alle Fälle kleiner ist als δ_1, und daß der relative Unterschied von δ_2 und δ_1 um so mehr verschwindet, je verdünnter die Lösung ist. Wir untersuchten daher die $[H^{\cdot}]$ in diesem Phosphatgemisch, indem wir es stufenweise mit reinem Wasser weiter verdünnten, in der Erwartung, daß die Werte für $[H^{\cdot}]$ mit zunehmender Verdünnung zu einem Grenzwert konvergierten, den wir durch eine geringfügige Extrapolation feststellen könnten. Dies gelang auch ganz leicht.

Diese Versuche ergaben folgendes.

I. Gemisch von gleichen Teilen prim. und sek. Phosphat, beide $^m/_{15}$.

EMK gegen die Standard-Acetatelektrode[1]).

Parallelversuche.

	a	b	c	Mittelwert	Temperatur	p_H	$[H^{\cdot}]\cdot 10^7$
1. Versuch	128,6	128,2	—	128,4	25°	6,804	1,57
2. "	128,4	128,5	129,0	128,6	26°	6,803	1,57
3. "	128,8	129,3	128,8	129,0	25°	6,813	1,54
					Mittel	6,807	1,56

II. Dasselbe Gemisch, aufs 5fache mit CO_2-freiem Wasser verdünnt ($^m/_{75}$).

	a	b	c	Mittelwert	Temperatur	p_H	$[H^{\cdot}]\cdot 10^7$
1. Versuch	140,0	138,2	138,8	139,0	24,5°	6,961	1,09
2. "	138,7	138,8	139,4	139,0	26,0°	6,974	1,06
					Mittel	6,967	1,075

III. Dasselbe Gemisch wie I, aufs 25fache verdünnt ($^m/_{375}$).

	a	b	c	Mittelwert	Temperatur	p_H	$[H^{\cdot}]\cdot 10^7$
1. Versuch	141,5	142,3	—	141,9	24,5°	7,038	0,917
2. "	141,0	142,0	142,1	141,7	26,0°	7,021	0,953
					Mittel	7,030	0,930

IV. Dasselbe Gemisch wie I, aufs 50fache verdünnt ($^m/_{750}$).

	a	b	Mittel			$K\cdot 10^{+7}$
1. Versuch	143,7	143,1	143,4	26°	7,050	0,89

Tragen wir diese Befunde in ein Diagramm (Fig. 1) ein, so ergibt sich durch eine ganz geringfügige Extrapolation, die sicher keine größeren Fehler veranlaßt als der Methode an sich anhaften:

$$k_2 = 0{,}88 \cdot 10^{-7}.$$

Die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Wert um mehr als $\pm 5\%$ vom wahren Wert abweicht, ist sehr gering. Wie man sieht, unterscheidet er sich von dem früher gebrauchten ($1{,}95 \cdot 10^{-7}$) bedeutend.

Um nun das Phosphatgleichgewicht in den Körperflüssigkeiten zu berechnen, muß man das Verhältnis $\frac{\delta_2}{\delta_1}$ in denselben kennen. Dieses hängt fast nur von dem Gesamt-Na-Gehalt der Körperflüssigkeiten ab. Um es zu ermitteln, fügten wir

[1]) Gemessen wurde in Wirklichkeit stets gegen die gesättigte Kalomelelektrode, deren Potential gegen das Standard-Acetatgemisch sehr häufig, fast täglich kontrolliert wurde.

zu der aufs 7fache verdünnten (also etwa 0,01 mol.) Lösung von gleichen Teilen $^{m}/_{15}$ prim. und sek. Phosphat noch NaCl in Substanz hinzu, und zwar zwischen 0,4 und 2%.

Die Lösung mit 0,4% NaCl ergab:

	a	b	c	Mittel	Temperatur	p_H	$[H^{\cdot}] \cdot 10^7$
1. Versuch	128,5	128,4	128,4	128,4	27°	6,789	1,63
Die Lösung mit 0,85% NaCl ergab:							
1. Versuch	121,2	120,3	120,9	120,7	25,5°	6,671	2,13
2. "	121,1	120,0	121,0	120,7	25,0°	6,673	2,12
Dieselbe Lösung mit 1,5% NaCl:							
1. Versuch	116,2	115,8	116,0	116,0	26,0°	6,587	2,59
Die Lösung mit 2% NaCl ergab:							
1. Versuch	110,7	110,8	—	110,7	25,5°	6,501	3,16
2. "	110,8	111,0	110,4	110,7	25,0°	6,504	3,13

Hieraus berechnet sich bei einem Gehalt von NaCl

	0,4%	0,85%	1,5%	2%
$\frac{\delta_2}{\delta_1}$	1,85	2,52	2,94	3,62

Um in einer physiologischen Flüssigkeit das Phosphorsäuregleichgewicht zu berechnen, brauchen wir nur die Größe $k_2 \cdot \frac{\delta_2}{\delta_1}$ zu kennen. Wir wollen sie als die „reduzierte Konstante" der Phosphorsäure, k_2', bezeichnen. Es ist dann

$$\frac{[\text{prim. Phosphat}]}{[\text{sek. Phosphat}]} = \frac{[H^{\cdot}]}{k_2'}.$$

k_2' beträgt für einen NaCl-Gehalt von

0,85%	1,5%	2%
$2{,}12 \cdot 10^{-7}$	$2{,}59 \cdot 10^{-7}$	$3{,}15 \cdot 10^{-7}$

Die dazwischen liegenden Werte von k_2' können wir graphisch aus Fig. 2 interpolieren.

Jetzt erst, auf Grund dieser Daten, sind wir wirklich imstande, die Verteilung der Phosphorsäure auf das primäre und das sekundäre Salz in einer Körperflüssigkeit anzugeben. Wir müssen dazu also: 1. die $[H^{\cdot}]$ genau messen; 2. den Gesamt-Na-Gehalt einigermaßen genau messen; meist wird statt dessen eine Cl-Bestimmung verwendet werden dürfen; 3. dürfen andere Kationen, insbesondere mehrwertige, gegenüber dem Na nicht

in **wesentlichen** Mengen vorhanden sein, eine Bedingung, die für physiologische Flüssigkeiten wohl stets erfüllt ist.

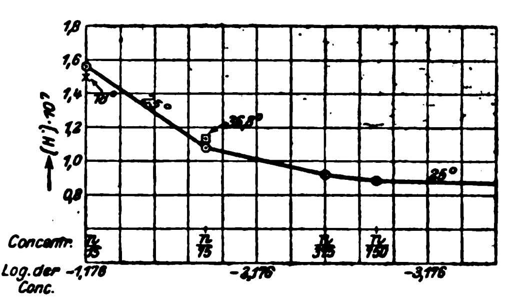


Fig. 1. In einem Gemisch von molar gleichen Mengen KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 wird $[H^{\cdot}]$ bestimmt.
Abszisse: Konzentration der Phosphate (zusammengenommen), logarithmisch eingetragen.
Ordinate: $[H^{\cdot}] \times 10^7$.

Zu berücksichtigen ist nun noch die etwaige Änderung dieser Konstanten mit der Temperatur. Unsere Messungen beziehen sich auf etwa 25°. Die Änderung der Konstante bei 37° läßt sich wie üblich berechnen nach der Formel

$$\frac{d \log k}{d\,T} = \frac{U}{4{,}571 \cdot T^2},$$

wo T die (mittlere) absolute Temperatur, also fast genau 300 bedeutet, U die Wärmetönung der Reaktion:

$$H_2PO_4' \longrightarrow HPO_4'' + H^{\cdot}$$

Diese läßt sich calorimetrisch angenähert bestimmen, indem man 1 Mol $Na_2HPO_{4,aq}$ mit 1 Mol $HCl_{,aq}$ versetzt und die Wärmetönung mißt. Wir benutzten dazu ein Calorimeter, das aus einem Dewar-Gefäß („Thermosflasche") bestand, und werden auf die prinzipiell der üblichen ähnliche Methodik an anderer Stelle eingehen. Beim Vermischen von $^1/_{100}$ Mol Na_2HPO_4, gelöst in 200 ccm Wasser, und $^1/_{100}$ Mol HCl, gelöst in 100 ccm Wasser, entstand eine Temperaturerhöhung von

a) 0,070° ⎫
b) 0,070° ⎬ bei 24 bis 25°
c) 0,065° ⎭
d) 0,077° bei 20°

im Mittel 0,070°, was gemäß der Eichung des Calorimeters eine Wärmetönung von 1560 g-Cal. pro 1 Mol bedeutet. Danach berechnet sich, wenn wir die Temperatur gleich 300 setzen,

$$\frac{d \log k_2}{dT} = 0{,}003_8$$

Danach wäre $\log k_{2 \text{ für } 38^\circ} = \log k_{1 \text{ für } 25^\circ} + 0{,}04_9$.

Die direkten elektrometrischen Messungen ergeben bei etwa 37°:

1. 5fach verdünntes Phosphatgemisch

a	b	c	Mittel	Temperatur	p_H	p_H war für ca. 25° nach der früheren Messung
142,0	141,0	142,0	141,7	36,8°	6,946	6,967

2. 7fach verdünntes Phosphatgemisch + 0,4 °/₀ NaCl

a	b	c	Mittel	Temperatur	p_H	p_H früher
[128,3]	130,0	130,0	130,0	36,8°	6,754	6,789

3. 7fach verdünntes Phosphatgemisch + 0,85 °/₀ NaCl

a	b	c	Mittel	Temperatur	p_H	p_H früher
124,6	124,5	124,8	124,6	38,6°	6,655	6,672

4. 7fach verdünntes Phosphatgemisch + 2 °/₀ NaCl

a	b	c	Mittel	Temperatur	p_H	p_H früher
1. Versuchsreihe						
114,9	114,6	114,0	114,5	39°	6,489	6,503
2. Versuchsreihe						
113,0	112,2	113,0	112,7	36,8°	6,473	

Die Differenzen der p_H bei den beiden Temperaturen von 25 und 37° betragen demnach 0,021, 0,035, 0,017, 0,014, 0,030, im Mittel 0,0234, während sie nach der thermodynamischen Berechnung 0,049 betragen sollten. Da der Unterschied der beobachteten und der berechneten Differenz einem Potentialunterschied von nur 1,5 Millivolt entspricht und da die thermodynamische Berechnung wegen der nicht totalen Dissoziation des sekundären Phosphats nur eine angenäherte sein kann, so ist die Übereinstimmung praktisch befriedigend.

Nach einer brieflichen Mitteilung von Hasselbalch unterscheidet sich der p_H in Phosphatgemischen, die man einmal bei 18°, ein zweites Mal bei 37° mißt, um + 0,07; nach der thermodynamischen Berechnung sollte der Unterschied 0,068 sein, in bester Übereinstimmung. Wir können also unsere bei 25° gewonnenen Konstanten für 38° dadurch korrigieren, daß

wir ihren Logarithmus um etwa 0,03 verkleinern oder die Konstanten selbst um rund 7 % vergrößern. Für die Werte von $\frac{\delta_2}{\delta_1}$ dürfen wir wohl annehmen, daß sie sich innerhalb dieses Temperaturintervalls nicht merklich ändern.

Wollen wir diese Korrektur für Körpertemperatur noch anbringen, so würden wir alle Werte für k_2' um etwa 7 % erhöhen. Dieser Korrektur entspricht in Fig. 2 die oberste der gezeichneten Kurven; die unterste die bei gleichem Temperaturkoeffizienten für 18° berechnete.

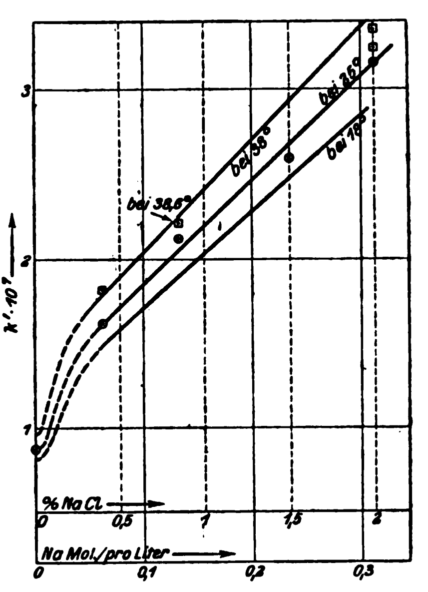


Fig. 2. In einer Lösung, die zusammen 0,00952 molar an Phosphaten ist (zur Hälfte primär, zur Hälfte sekundär), wird nach Zugabe von NaCl die [H˙] gemessen. Diese [H˙] ist die „reduzierte Konstante der Phosphorsäure". Abszisse: Gehalt an NaCl, ausgedrückt entweder in Prozent NaCl oder in Molen.
Ordinate: $k' \cdot 10^7$.

Wollen wir auf Grund dieses Diagramms die wichtigsten Werte zusammenstellen, so ergibt sich für die „reduzierte Dissoziationskonstante", k', der Phosphorsäure, unter der Voraussetzung, daß Phosphate in geringer Konzentration sich neben einem Überschuß von NaCl in Lösung befinden, folgendes:

NaCl-Gehalt in Gewichtsprozenten	k' bei 18°	bei 25°	bei 37°
0,5 %	$1{,}60 \cdot 10^{-7}$	$1{,}70 \cdot 10^{-7}$	$1{,}88 \cdot 10^{-7}$
1,0 %	$2{,}03 \cdot 10^{-7}$	$2{,}20 \cdot 10^{-7}$	$2{,}40 \cdot 10^{-7}$
1,5 %	$2{,}47 \cdot 10^{-7}$	$2{,}66 \cdot 10^{-7}$	$2{,}92 \cdot 10^{-7}$
2,0 %	$2{,}90 \cdot 10^{-7}$	$3{,}15 \cdot 10^{-7}$	$3{,}40 \cdot 10^{-7}$

Wir wollen an der Hand dieser Daten zum Schluß noch die Phosphorsäureverteilung im Blutplasma berechnen. Setzen wir seine [H˙] für 38° $= 4{,}5 \cdot 10^{-8}$ und seinen Na-Gehalt $= 0{,}9$ %,

gerechnet als NaCl, so wäre für k' der Wert $2{,}3 \cdot 10^{-7}$ anzuwenden, und es ist

$$\frac{[\text{prim. Phosphat}]}{[\text{sek. Phosphat}]} = \frac{4{,}5 \cdot 10^{-8}}{2{,}3 \cdot 10^{-7}} = \frac{0{,}196}{1} = \frac{1}{5{,}10}.$$

Um also einer physiologischen Kochsalzlösung die $[H^{\cdot}]$ des Blutes zu erteilen, braucht man ihr nur eine kleine Menge ($^{n}/_{50}$ bis $^{n}/_{100}$) Phosphate hinzuzufügen, und zwar auf 1 molaren Teil primäres Phosphat 5,1 Teile sekundäres Phosphat.

In einem Harn von der $[H^{\cdot}] = 1 \cdot 10^{-6}$ ist das Phosphatverhältnis

bei einem Gehalt von 1 % NaCl = 4,17:1
" " " " 2 % NaCl = 2,94:1

In Harn von $[H^{\cdot}] = 1 \cdot 10^{-5}$
bei 1 % NaCl = 41,7:1
" 2 % NaCl = 29,4;1

Stereoisomerie und Elektronentheorie.

Von

H. Pauly.

(Eingegangen am 4. August 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die Annahme von Elektrizitätsatomen als Ursache der gegenseitigen Anziehung der Atome[1]) führt zu einer Umgestaltung unserer Vorstellungen über die Art der Valenzbetätigung. Der älteren Vorstellung nach findet die Bindung zwischen zwei Atomen dadurch statt, daß sich die einzelnen beiderseitigen Anziehungskräfte unbedingt absättigen, was auch zu mehrfachen Bindungen zwischen jenen führen kann (Begriff der konstanten Valenz). Die Zahl der so erfolgenden Neutralisationen zwischen den beiden Atomen wurde bisher durch eine entsprechende Anzahl von Bindestrichen angezeigt. Diese Schreibweise hat sich wegen ihrer Bequemlichkeit allgemein eingebürgert, obwohl ihr schon lange bekannte charakteristische Eigenschaften der ungesättigten Verbindungen entgegenstehen.

Auf stereochemischem Gebiete hat diese Anschauung in Verbindung mit dem Bilde vom Kohlenstofftetraeder bekanntlich zu der Theorie von der cis-trans-Isomerie geführt. Eine der für sie sowohl, wie auch für die Annahme der mehrfachen Bindung wichtigsten Stützen erblickt man in dem Umstande, daß es bisher nicht gelungen ist, von Substanzen mit der Gruppierung $\begin{matrix}-\mathrm{C}-\\ \vdots\\ -\mathrm{C}-\end{matrix}$ mehr als zwei, und insbesondere auch keine

---

[1]) Vgl. Dr. P. Ruggli, Die Valenzhypothese von J. Stark vom chemischen Standpunkt. Sammlung chem. und chem.-techn. Vorträge 1912. — Kaufmann, Die Valenzlehre, S. 526 ff., Stuttgart 1911. — J. Tafel, Zeitschr. f. Elektrochemie 1912, S. 71. — Pauly und v. Buttlar, Ann. d. Chem. **383**, 254 ff., 1911.

optisch aktive Formen aufzufinden, sofern nicht durch eine besondere Gruppe hierfür die Vorbedingung von vornherein gegeben war.

Diese Theorie läßt sich aber, wie E. Erlenmeyer[1]) in einer soeben erschienenen Mitteilung erneut hervorhebt, nicht mehr aufrecht erhalten, nachdem nicht nur die Auffindung von mehr als zwei stereoisomeren Formen der Zimtsäure, sondern auch der Nachweis der Existenz optisch aktiver Zimtsäuren und optisch aktiver Benzaldehyde gelungen ist. Erlenmeyer sieht sich genötigt, die nur zwei stereoisomere Formen ermöglichende Vorstellung von der Festlegung zweier Kohlenstofftetraeder — infolge zweifacher Bindung — durch eine neue, die Asymmetrie des Moleküls betonende Hypothese zu ersetzen, die sich aufs engste an die Le Bel-van t'Hoffsche Anschauung vom asymmetrischen Kohlenstoffatom anschließt. Er nimmt mit Hinrichsen[2]) an Stelle der doppelten Bindung das Vorhandensein je einer freien Valenz an den beteiligten Kohlenstoffatomen an und deutet die Spiegelbildisomerie der Zimtsäuren durch die Bilder

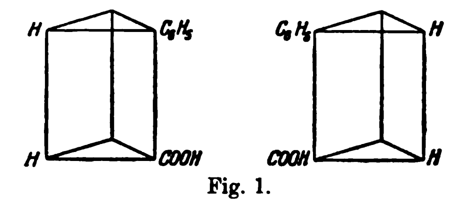


Fig. 1.

Diese ist dadurch gegeben, daß die vier Substituenten in einer außerhalb der Verbindungslinie der (nicht eingezeichneten) Zentralkohlenstoffatome befindlichen Ebene liegen.

Diese Formelbilder Erlenmeyers nähern sich nun so sehr denjenigen, die die Valenzelektronentheorie für die gleichen Verbindungen aufstellt, daß zwischen beiden Gruppen ein wesentlicher Unterschied nicht mehr zu ersehen ist[3]). Nur bringen die Elektronenformeln den Gedanken Erlenmeyers noch be-

[1]) Diese Zeitschr. 46, 348, 1914; vgl. auch 85, 153, 1911.

[2]) Ann. d. Chem. 336, 168, 1906.

[3]) Nach gefl. brieflicher Mitteilung war Hr. E. der Valenzelektronentheorie bisher nicht näher getreten, doch hatte er bei den beobachteten Erscheinungen selbst schon eine Funktion der Elektronen vermutet.

stimmter zum Ausdruck. Bei ihnen wird die Existenz optisch aktiver Antipoden geradezu zu einer Notwendigkeit, weil an Stelle der ihrem Wesen nach dunklen Richtkraft oder freien Valenz (die unbesetzte Stelle in den obigen Formeln bezeichnet deren Richtung von den hineinzudenkenden Zentralatomen aus) ein wirkliches Atom, nämlich das elektrische, oder das Elektron, wie man es zu bezeichnen pflegt, tritt. Es steht nichts im Wege, bei der Versinnbildlichung solcher elektroatomistischer Formeln sich ebenso der Tetraeder zu bedienen, wie auch sonst, und man kommt so zu einer vollkommen einheitlichen Darstellungsweise der Stereochemie sowohl der gesättigten, wie der ungesättigten Verbindungen. Die Formelbilder für d- und l-Zimtsäure sehen nämlich elektroatomistisch so aus:

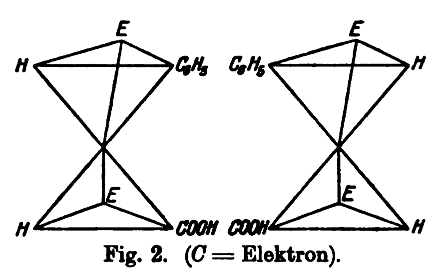


Fig. 2. (*C* = Elektron).

Es ist wohl überflüssig zu bemerken, daß solche Formeln die gleiche Anzahl und Art von Isomeren bedingen wie die Formeln von Erlenmeyer, denn sie drücken ja das Gleiche, nur in einem etwas geänderten Bilde aus.

In gleich deutlicher Weise ergibt sich, daß auch Benzaldehyd ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält. Die Valenzelektronenformel (I) entspricht völlig der „Lückenformel" (II) Erlenmeyers.

$$\text{(I)}\quad C_6H_5\overset{*}{C}\begin{cases}H\\ O-\circ\\ \circ\end{cases}{}^{1)}\qquad \text{(II)}\quad C_6H_5\overset{*}{C}\begin{cases}H\\ O-L\\ L\end{cases}$$

(L = „Lücke", syn.: freie Valenz).

Mit der Annahme von Elektronen wird die Leichtigkeit, mit der die optische Aktivität bei den ungesättigten Verbindungen hervorgerufen werden kann und auch wieder verschwindet, verständlich. Haben wir es doch nach Ansicht der

[1]) —o Symbol für Elektron nach J. Stark.

Physiker mit ungeheuer kleinen und beweglichen atomartigen Teilchen zu tun, die natürlich viel leichter orientiert werden als die im Minimum ungefähr zweitausendmal größeren gewöhnlichen Atome.

Im Anschlusse hieran sei noch darauf hingewiesen, daß durch die Elektronenformeln in überzeugender Weise die von Aug. Kekulé und R. Anschütz in einer grundlegenden Arbeit[1]) nachgewiesene enge Beziehung der Maleinsäure zur inaktiven Weinsäure und der Fumarsäure zur Traubensäure zur Erkenntnis gebracht wird, deren Augenfälligkeit ihre Entdecker damals zu der Bemerkung veranlaßte:

„Es drängt sich der Gedanke auf, es könne vielleicht die Ursache der Isomerie der Fumarsäure und der Maleinsäure derselben Art sein, wie die der Traubensäure und inaktiven Weinsäure. Dann sollten außer der inaktiven noch zwei aktive Modifikationen der Maleinsäure existieren, die durch Spaltung der Fumarsäure erhalten werden können.“ Wenn dies nun auch noch nicht gelungen ist, so darf man doch heute, nach der aufsehenerregenden Entdeckung Erlenmeyers, den früheren negativen Ergebnissen keine allzugroße Bedeutung mehr beilegen. Um so weniger, als auch in seinen Fällen die optische Zerlegung nur unter ganz besonderen Bedingungen und von allen optisch aktiven Substanzen bisher allein mittels Weinsäure erreicht werden konnte. Man wird also warten müssen, bis auch hier der richtige Weg der optischen Spaltung gefunden ist.

Nachschrift.

Nachträglich erklärt Erlenmeyer (diese Zeitschr. 66, 509), daß ihm die Bereitung dauernd aktiven Benzaldehydes bis jetzt nicht gelungen sei. Die obigen rein theoretischen Ausführungen werden dadurch natürlich in keiner Weise beeinträchtigt, umsoweniger, als jedenfalls die Gewinnung aktiver Mandelsäuren aus den „induzierten“ Benzaldehyden bestehen bleibt.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 14, 717, 1881.

Einfluß der mechanischen Zerstörung der Zellstruktur auf die verschiedenen Oxydationsprozesse der Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 31. Juli 1914.)

I.

Der Einfluß der verschiedenen Faktoren (Frische der Gewebe, Wirkung des Trypsins, der indifferenten Anaesthetica, der Gifte usw.) ist verschieden je nach dem Oxydationsprozeß, auf den man sie einwirken läßt. Es war zu erwarten, daß auch die Zerstörung der Zellstruktur auf die verschiedenen Oxydationsvorgänge eine verschiedene Wirkung ausüben würde.

Bei der Untersuchung des Einflusses des Zerreibens der Gewebe auf die eigentliche Atmung derselben, ohne Zusatz irgendeiner oxydablen Substanz, muß man vor allen Dingen zwischen der Wirkung des Zerreibens auf die Hauptatmung und der Wirkung auf die akzessorische Atmung unterscheiden.

Wir wollen daran erinnern, daß wir auf Grund unserer Untersuchungen zu dem Schlusse gekommen waren, daß in den Geweben der höheren Tiere zwei gänzlich verschiedene Atmungsprozesse existieren: die Hauptatmung und die akzessorische Atmung.

Die Hauptatmung existiert in allen Geweben und verschwindet mehr oder weniger schnell nach dem Tode des Tieres. Bisher war es uns nicht gelungen, die Hauptatmung in Abwesenheit von Zellen zu konstatieren. Die akzessorische Atmung existiert nur in bestimmten Geweben (Leber, Niere usw.), bleibt längere Zeit nach dem Tode des Tieres intakt und geht leicht in den wässerigen Auszug der Gewebe über.

Diese beiden soeben genannten Atmungsprozesse weisen außerdem noch andere charakteristische Eigentümlichkeiten auf, wodurch sie sich voneinander unterscheiden. Nähere Angaben hierüber findet man in unseren früheren diesbezüglichen Arbeiten[1]). Hier wollen wir nur noch darauf hinweisen, daß die akzessorische Atmung dieselben Charaktereigentümlichkeiten aufweist wie die echten Oxydasen, während die Hauptatmung sich wie die labilen Oxydone verhält.

Außer ihrer eigentlichen Atmung besitzen die Tiergewebe die Fähigkeit, eine gewisse Anzahl zugesetzter Substanzen energisch zu oxydieren, wie z. B. die Alkohole, das Xanthin, die Harnsäure, die Bernsteinsäure, die Zitronensäure, das p-Phenylendiamin usw. Aber die Katalysatoren, die die Oxydation dieser verschiedenen Substanzen zuwege bringen, haben nicht alle die gleichen Eigenschaften.

Die einen, d. h. die echten Oxydasen, gehen leicht in die wässerigen Auszüge der Gewebe über, werden durch Alkohol- oder durch Acetonbehandlung nicht vernichtet und widerstehen auch der Einwirkung des Trypsins. Diese Eigentümlichkeiten findet man bei der Alkoholoxydase, der Uricoxydase, der Xanthinoxydase usw.

Die anderen Katalysatoren, die Oxydone, gehen nicht in den wässerigen Auszug über, werden durch Behandeln mit Alkohol, Aceton und Trypsin vernichtet usw. Die Oxydone werden in stabile und labile Oxydone eingeteilt. Die stabilen Oxydone bleiben in den Geweben längere Zeit nach dem Tode des Tieres intakt; sie werden durch wiederholtes, längeres Auswaschen der Gewebe mit Wasser nicht vermindert usw. Die labilen Oxydone nehmen mehr oder weniger schnell nach dem Tode des Tieres in den Geweben ab und werden durch etwas längeres Waschen der Gewebe mit Wasser völlig vernichtet.

Wir haben den Einfluß der mechanischen Zerstörung der Zellstruktur auf diese verschiedenen Oxydationsprozesse oder Agentien untersucht: die Hauptatmung und die akzessorische Atmung, die Oxydasen, die stabilen und die labilen Oxydone. Die weitaus größte Zahl unserer Untersuchungen bezieht sich auf die stabilen Oxydone, und es sind hauptsächlich die Re-

[1]) Battelli und Stern, Die akzessorische Atmung in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 21, 487, 1909.

sultate dieser Untersuchungen, die wir in dieser Arbeit eingehender erörtern werden.

Der Hauptzweck dieser Untersuchungen war, zu entscheiden, ob alle Oxydationsprozesse in Abwesenheit jeder Zellstruktur vor sich gehen können. Für die Oxydasen war diese Frage bereits entschieden, denn man kann bekanntlich die Oxydasen leicht in wässeriger Lösung erhalten. Das gleiche gilt auch für die akzessorische Atmung, wie wir in früheren Untersuchungen festgestellt haben.

Anders verhielt es sich aber mit den Oxydonen und der Hauptatmung. Wir hatten bereits in unseren früheren Untersuchungen gesehen, daß diese Oxydationsvorgänge durch verschiedene Faktoren, wie das Trypsin, die indifferenten Narkotica, relativ wenig hohe Temperaturen usw. vernichtet werden. Aber diese verschiedenen Faktoren bewirkten nicht bloß eine Veränderung der physikalischen Zellstruktur, sondern verursachten außerdem chemische oder physikalische Veränderungen der Zellsubstanzen. Durch die mechanische Zerkleinerung könnte man hingegen eine Vernichtung der Zellstruktur bewirken, ohne eine Zustandsänderung der Zellsubstanzen herbeizuführen.

Wir werden nun sehen, daß wir in bezug auf die stabilen Oxydone zu einem definitiven Resultat gelangt sind, daß aber in bezug auf die labilen Oxydone und die Hauptatmung eine definitive Antwort noch aussteht.

II. Methode.

In unseren früheren Versuchen betreffend die Oxydationsprozesse waren die Gewebe bloß einer ziemlich groben Zerkleinerung in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine unterworfen worden, was eine Dissoziierung des Gewebes zur Folge hatte, aber die meisten Zellen intakt ließ. Das Zerreiben der Gewebe in einem Mörser mit Sand ist schwierig und langwierig. Außerdem sind die Resultate in bezug auf die Strukturzerstörung der Zellen unbefriedigend.

Es ist unumgänglich nötig, einen vervollkommneten Zerreibungsapparat hierzu zu benutzen. Warburg[1]) hat eine

[1]) Warburg, Über Beziehungen zwischen Zellstruktur und biochemischer Reaktion. Pflügers Arch. **145**, 277, 1912.

stählerne Kugelmühle benutzt, um die Struktur der roten Blutkörperchen zu vernichten. Wir haben den Apparat von Borrel benutzt, der es ermöglicht, in kurzer Zeit eine große Menge Gewebe zu zerreiben. Bekanntlich besteht die Borrelsche Mühle hauptsächlich aus stählernen flachen Messern, die beim raschen Drehen gegen die Wand der Mühle die Zellen zerquetschen. Bei genügend langem Mahlen erzielt man eine völlige Vernichtung der Zellstruktur.

Das von uns benutzte Verfahren war folgendes. Das Gewebe wird zuerst in einer gewöhnlichen Fleischmühle zerrieben und darauf in die Borrelsche Mühle gebracht. Je nach der Art des Gewebes fügt man eine mehr oder minder große Menge leicht alkalisch gemachten Wassers hinzu, um das Zerreiben zu erleichtern. Es empfiehlt sich, das zu benutzende Gewebe sowie das Wasser vorerst abzukühlen. Je nach den Versuchsbedingungen wird das Zerreiben mehr oder minder lang fortgesetzt.

Um das Erhitzen des Apparates und des Gewebes während des Zerreibens möglichst zu vermeiden, läßt man durch die Außenwand der Mühle sehr kaltes Wasser strömen. Außerdem braucht man die Vorsicht, das Mahlen von Zeit zu Zeit eine halbe Minute lang zu unterbrechen, wenn das Zerreiben längere Zeit dauern muß.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des auf diese Weise zerriebenen Gewebebreis beobachtet man in dem Maße, wie das Zerreiben fortgesetzt wird, eine Abnahme der Zellen, die noch eine gewisse Struktur besitzen. Nach einem 1 Minute lang dauernden Zerreiben findet man noch eine große Anzahl von Zellen, die ihre Struktur bewahrt haben. Aber nach einem 4—5 Minuten langen Zerreiben bleiben nur noch sehr wenige Zellen übrig, die eine merkbare Struktur aufweisen. Durch Zusatz von 2 oder 3 Volumen Wasser zu dem Gewebebrei und nachfolgendes Zentrifugieren während 2 bis 3 Minuten erhält man eine je nach dem Gewebe mehr oder minder trübe Flüssigkeit, die bei der mikroskopischen Untersuchung keine Spur von Zellen oder Zellfragmenten aufweist, die eine sichtbare morphologische Struktur besitzen.

Die in diesen Versuchen zur Bestimmung der Oxydationsenergie benutzte allgemeine Methode ist dieselbe wie in unseren

früheren Untersuchungen über den Gaswechsel der Gewebe. Diese Methode besteht hauptsächlich darin, daß das zerriebene mit Wasser versetzte Gewebe bzw. der Gewebeauszug usw. in einer Sauerstoffatmosphäre bei einer Temperatur von 38 bis 40° energisch geschüttelt wird. Am Ende des Versuches wird die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs und der produzierten Kohlensäure gemessen.

III. Einfluß des Zerreibens auf die stabilen Oxydone.

Zu den stabilen Oxydonen gehören das Succinicoxydon und das Phenylendiaminoxydon. Das Succinicoxydon oxydiert die Bernsteinsäure zu Apfelsäure und Fumarsäure[1]). Das Phenylendiaminoxydon oxydiert das p-Phenylendiamin zu einem Farbstoff, dessen Zusammensetzung bisher nicht gut bestimmt ist.

Bei der großen Stabilität dieser Oxydone konnte man die Hoffnung hegen, das Zerreiben der Gewebe lange Zeit fortsetzen zu können, ohne diese Oxydone zu vernichten.

Die ersten hierbei erzielten Resultate waren ziemlich widersprechend in bezug auf das Succinicoxydon[2]). Bald zeigte sich nach kurzem Zerreiben eine recht große Verminderung, bald jedoch blieb das Succinicoxydon auch nach lange fortgesetztem Zerreiben intakt.

Wir bemerkten bald, daß die scheinbare Vernichtung des Succinicoxydons hauptsächlich durch die Gegenwart von fein zerriebenem Gummi bedingt war. In der Borrelschen Mühle befindet sich nämlich zwischen dem Deckel und der Kapsel eine ziemlich dicke Gummiplatte, die den Zweck hat, einen hermetischen Verschluß des Apparates zu sichern. Bei der Bewegung der Mühle kommen die Messer in Berührung mit der Gummiplatte, und die kleinen abgeschabten Gummifragmente vermengen sich mit dem Gewebe und werden zerrieben. Diese Gummifragmente verhindern die Oxydation der Bernsteinsäure, wenn sie in genügender Menge vorhanden sind. Man kann

---

[1]) Anmerkung. Das Auftreten von Fumarsäure unter den Oxydationsprodukten der Bernsteinsäure ist in jüngster Zeit von H. Einbeck festgestellt worden.

[2]) Battelli et Stern, Influence de la destruction de la structure cellulaire sur les différents processus d'oxydation dans les tissus animaux. Soc. de Biol. 76, 575, 1914.

sich leicht davon überzeugen, wenn man kleine Gummistückchen in der Borrelschen Mühle zerreibt und die Masse hernach zu normalem Gewebe hinzusetzt. Die Oxydation der Bernsteinsäure wird unter diesen Bedingungen völlig verhindert.

Wir haben nicht näher untersucht, ob der Gummi das Succinicoxydon direkt verändert oder ob er durch bloße Anwesenheit auf die Reaktion wirkt. Doch scheinen mehrere Versuche dafür zu sprechen, daß der Gummi eine Kontaktwirkung ausübt.

Die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe wird durch die Anwesenheit von Gummi nicht beeinflußt.

Um den störenden Einfluß des Gummi auszuschalten, haben wir natürlich die Borrelsche Mühle etwas modifizieren müssen, in der Weise, daß der Kontakt der Gewebe mit dem Gummi vermieden wurde.

Da die Gewebe nach dem Tode des Tieres eine gewisse Acidität aufweisen, die beim Zerreiben der Gewebe eine schädigende Wirkung auf die Oxydone ausüben könnte, haben wir vor dem Zerreiben zum Gewebe $^1/_3$ Volumen leicht alkalischen Wassers hinzugesetzt (NH_3 1 : 1500 z. B.).

In der Tabelle I stellen wir die Resultate einiger typischer Versuche zusammen, die mit den verschiedenen Geweben ausgeführt sind.

Die in dieser Tabelle angeführten Ergebnisse zeigen deutlich, daß alle Gewebe, nachdem sie 5 oder 10 Minuten lang zerrieben wurden, die Fähigkeit p-Phenylendiamin zu oxydieren, ganz bewahrt haben. Das Oxydationsvermögen gegenüber der Bernsteinsäure bleibt in einigen Geweben intakt, wie z. B. in dem Herzmuskel und den Muskeln des Pferdes, der Leber des Hundes usw., aber häufig beobachtet man eine deutliche Verminderung in der Leber des Rindes, des Pferdes und des Hammels, bisweilen auch in den Muskeln des Rindes. Es gibt in der Beziehung zahlreiche individuelle Ausnahmen.

Wir haben nicht näher untersucht, ob diese Verminderung der Oxydationswirkung gegenüber Bernsteinsäure durch eine Abschwächung des Succinicoxydons der Leber bewirkt ist, oder auf die Bildung von hemmenden Substanzen durch den Kontakt der Leber mit den Metallwänden der Mühle während des Zerreibens zurückzuführen ist.

Tabelle I.

Sauerstoffaufnahme durch 100 g Gewebe, nach Zerkleinern in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine oder nach Zerreiben in der Borrelschen Mühle, zur Oxydation der Bernsteinsäure oder der p-Phenylendiaminsäure. Die Flaschen sind mit Sauerstoff gefüllt; die Temperatur des Thermostaten beträgt 40° und die Dauer des Schüttelns 30 Minuten.

Gewebe	Zerkleinerungsapparat	Zugesetzte Substanz	Aufgenommener O_2 ccm
Muskel vom Pferd	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	140
	„	Bernsteinsäure	150
	Borrelsche Mühle 10′	Phenylendiamin	145
	„ „ 10′	Bernsteinsäure	140
Muskel vom Rind	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	150
	„	Bernsteinsäure	155
	Borrelsche Mühle 3′	Phenylendiamin	157
	„ „ 3′	Bernsteinsäure	150
	„ „ 10′	Phenylendiamin	155
	„ „ 10′	Bernsteinsäure	110
Herz vom Pferd	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	120
	„	Bernsteinsäure	170
	Borrelsche Mühle 10′	Phenylendiamin	110
	„ „ 10′	Bernsteinsäure	90
Leber vom Rind	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	110
	„	Bernsteinsäure	150
	Borrelsche Mühle 5′	Phenylendiamin	95
	„ „ 5′	Bernsteinsäure	70
	„ „ 10′	Phenylendiamin	95
	„ „ 10′	Bernsteinsäure	40
Leber vom Hammel	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	90
	„	Bernsteinsäure	155
	Borrelsche Mühle 10′	Phenylendiamin	85
	„ „ 10′	Bernsteinsäure	90
Leber vom Hund	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	170
	„	Bernsteinsäure	180
	Borrelsche Mühle 5′	Phenylendiamin	150
	„ „ 5′	Bernsteinsäure	160
Gehirn vom Hammel	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	205
	„	Bernsteinsäure	106
	Borrelsche Mühle 5′	Phenylendiamin	200
	„ „ 5′	Bernsteinsäure	87
Niere vom Rind	Fleischhackmaschine	Phenylendiamin	120
	„	Bernsteinsäure	150
	Borrelsche Mühle 5′	Phenylendiamin	110
	„ „ 5′	Bernsteinsäure	140
Niere vom Pferd	Fleischhackmaschine	„	160
	Borrelsche Mühle	„	165

Diese hier angeführten Resultate gestatten die Behauptung aufzustellen, daß die Wirkung der stabilen Oxydone nicht von der Zellstruktur abhängt. Diese Schlußfolgerung wird in definitiver Weise durch die über die Oxydationswirkung der

wässerigen Gewebeauszüge angestellten Versuche bestätigt, von denen bald die Rede sein wird.

IV. Löslichkeit der stabilen Oxydone in Wasser.

In unseren früheren Arbeiten über die Oxydone[1]) hatten wir gezeigt, daß die in einer gewöhnlichen Fleischmühle zerriebenen Muskeln wiederholt mit Wasser gewaschen werden können, ohne eine merkliche Verminderung der Oxydonmenge zu erleiden. Wir hatten hieraus geschlossen, daß die Oxydone in Wasser unlöslich sind. Diese Schlußfolgerung ist jedoch nicht ganz richtig, wie wir sehen werden.

Nachdem wir die Beobachtung gemacht hatten, daß die Zerstörung der Zellstruktur durch längeres Zerreiben die stabilen Oxydone nicht schädigt, haben wir versucht, diese Oxydone in wässeriger Lösung zu erhalten. Wir haben hierbei folgendes Verfahren benutzt.

Der durch Zerreiben in der Borrelschen Mühle hergestellte Gewebebrei wird mit dem 2- oder 3fachen Volumen leicht alkalischen Wassers versetzt (NaOH 1 : 5000). Es ist notwendig, eine alkalische Flüssigkeit zu benutzen. Setzt man gewöhnliches Wasser hinzu, so ist die Reaktion des Mediums sauer und die Oxydone gehen nicht in Lösung, da sie in saurem Medium unlöslich sind, wie wir im folgenden Abschnitt sehen werden.

Der Gewebebrei wird einige Minuten unter häufigem Umschütteln mit dem alkalischen Wasser in Kontakt gelassen und hierauf energisch längere Zeit zentrifugiert. Man erhält auf diese Weise drei Schichten: eine untere dünne Schicht, bestehend aus Fragmenten von Fasern, eine mittlere körnige Schicht und eine obere flüssige Schicht.

Diese Flüssigkeit ist je nach dem benutzten Gewebe mehr oder weniger klar. In den Auszügen der Leber, der Niere, des Gehirns ist bei der mikroskopischen Untersuchung keine Spur von Zellstruktur zu erkennen, aber die Flüssigkeit ist ziemlich trübe. Die Muskeln hingegen sowie das Herz des Rindes, des Pferdes u. a. liefern eine opalescierende, aber im übrigen recht klare Flüssigkeit.

---

[1]) Battelli und Stern, Einfluß der Anaesthetica auf die Oxydone. Diese Zeitschr. 52, 226, 1913.

Wir haben hauptsächlich diese Auszüge der Muskeln und des Herzens als Lösungen von stabilen Oxydonen benutzt.

Nach Zusatz von bernsteinsaurem Natrium oder von p-Phenylendiamin wird das Reaktionsgemisch wie gewöhnlich in einer Sauerstoffatmosphäre bei 40° energisch geschüttelt.

Wir führen als Beispiel einige Versuchsresultate an, die sich auf die Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins in Gegenwart dieser wässerigen Auszüge beziehen.

Tabelle II.

Sauerstoffaufnahme durch 100 g Gewebe oder durch die entsprechende Menge des klaren wässerigen Auszuges zur Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten.

Gewebe	Zerkleinerungsapparat	Zugesetzte Substanz	Aufgenommener O_2 ccm
Muskel vom Pferd	Borrelsche Mühle 5'	Phenylendiamin	176
	„ „ 5'	Bernsteinsäure	180
	Wässeriger Auszug	Phenylendiamin	110
	„ „	Bernsteinsäure	120
Herz vom Pferd	Borrelsche Mühle 4'	Phenylendiamin	190
	„ „ 4'	Bernsteinsäure	210
	Wässeriger Auszug	Phenylendiamin	160
	„ „	Bernsteinsäure	155
Herz vom Pferd	Borrelsche Mühle 10'	Phenylendiamin	200
	„ „ 10'	Bernsteinsäure	190
	Wässeriger Auszug	Phenylendiamin	180
	„ „	Bernsteinsäure	160
Herz vom Rind	Borrelsche Mühle 5'	Phenylendiamin	160
	„ „ 5'	Bernsteinsäure	170
	Wässeriger Auszug	Phenylendiamin	100
	„ „	Bernsteinsäure	70

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß nach Zerstörung der Zellstruktur die stabilen Oxydone durch schwach alkalisches Wasser extrahiert werden können. In einigen Fällen verlieren die Oxydone bei den verschiedenen Manipulationen einen Teil ihrer Wirkungsfähigkeit, aber in anderen Fällen enthält der auf die oben beschriebene Weise hergestellte wässerige Auszug ungefähr die Gesamtmenge der stabilen Oxydone des betreffenden Gewebes.

Wir können hinzufügen, daß die Oxydone längere Zeit (z. B. 24 Stunden) in dem wässerigen Auszuge intakt bleiben,

wenn der Auszug bei niedriger Temperatur aufbewahrt wird und die Reaktion leicht alkalisch bleibt.

Wenn wir von der Löslichkeit der stabilen Oxydone in Wasser sprechen, so wollen wir keineswegs entscheiden, ob es sich um eine echte Lösung oder um eine kolloidale Lösung handelt. Man kann hier dieselben Argumente entwickeln, die in den Diskussionen betreffend die Natur der Enzyme im allgemeinen angeführt worden sind. Bekanntlich nimmt die Mehrzahl der Forscher an, daß die Enzyme in Wasser eine kolloidale Lösung bilden, was jedoch nicht mit Bestimmtheit bewiesen ist.

V. Fällung der stabilen Oxydone durch organische Säuren.

Die sich selbst überlassenen wässerigen Auszüge der Gewebe bilden nach und nach einen mehr oder minder großen Bodensatz in dem Maße, wie die Reaktion des Mediums sauer wird. Der so entstandene Bodensatz enthält zum großen Teil die in dem wässerigen Auszug befindlichen stabilen Oxydone.

Um eine schnelle Fällung der Oxydone zu bewirken, genügt es, die Flüssigkeit durch Zusatz einer organischen Säure, z. B. Essigsäure, in einer Gesamtkonzentration von 1 : 2000 bis 1 : 3000 anzusäuern. Der Niederschlag ist je nach dem zur Bereitung des Extraktes benutzten Gewebe mehr oder weniger groß. Er ist sehr groß bei Benutzung der Niere oder der Leber, hingegen sehr klein, wenn man den Auszug von Muskel oder Herz verwendet.

Nach Zusatz der Säure wird der Auszug sofort energisch zentrifugiert. Man erhält eine völlig durchsichtige Flüssigkeit und einen Bodensatz. Der flüssige Teil wird neutralisiert und der Bodensatz in leicht alkalischem Wasser gelöst.

In schwacher Konzentration bewirkt die Essigsäure keine merkliche Schädigung der Oxydone, vorausgesetzt, daß der Kontakt nicht zu lange dauert. Es ist also notwendig, schnell zu zentrifugieren und gleich darauf den Bodensatz leicht alkalisch zu machen.

In der folgenden Tabelle stellen wir einige typische Versuchsresultate zusammen, die sich auf die mit Essigsäure behandelten Auszüge der Muskeln oder des Herzens beziehen. Diese Auszüge sind durch Zusatz von 2 Volumen leicht alka-

lischen Wassers zum 5 Minuten lang zerriebenen Gewebe und nachfolgendes energisches Zentrifugieren hergestellt worden. Der Auszug wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und zentrifugiert, der flüssige Teil abgehoben und der Bodensatz mit leicht alkalischem Wasser auf das ursprüngliche Volumen des Auszuges gebracht.

Tabelle III.

Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins durch den flüssigen Teil oder den Niederschlag von 100 ccm mit Essigsäure behandelten Gewebeauszug.

Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten.

Gewebe	Zubereitung	Zugesetzte Substanz	Aufgenommener O_2 ccm
Muskel vom Pferd	Wässeriger Auszug	Bernsteinsäure	38
	" "	Phenylendiamin	47
	Niederschlag	Bernsteinsäure	26
	"	Phenylendiamin	34
	Flüssiger Teil	Bernsteinsäure	3
	" "	Phenylendiamin	7
Herz vom Pferd	Wässeriger Auszug	Bernsteinsäure	62
	" "	Phenylendiamin	58
	Niederschlag	Bernsteinsäure	50
	"	Phenylendiamin	42
	Flüssiger Teil	Bernsteinsäure	4
	" "	Phenylendiamin	6

Die in der Tabelle III zusammengestellten Resultate zeigen deutlich, daß die Oxydone durch Essigsäure gefällt werden. Der nach Zusatz von Essigsäure entstehende Niederschlag enthält den weitaus größten Teil der im Auszuge befindlichen Oxydone. Der flüssige Teil hingegen enthält nur Spuren davon.

Die Fällung durch Essigsäure gibt die Möglichkeit, große Mengen stabiler Oxydone in einem relativ kleinen Volumen herzustellen und außerdem die Oxydone zu reinigen, indem man sie von den in der Lösung zurückbleibenden Substanzen befreit.

VI. Einfluß höherer Temperaturen, des Trypsins, der indifferenten Narkotica auf die in Wasser gelösten Oxydone.

In früheren Arbeiten haben wir den Einfluß verschiedener Faktoren auf die in den verschiedenen Geweben enthaltenen Oxydone untersucht.

Unter diesen Faktoren hatten wir hauptsächlich die Temperatur[1]), das Trypsin[2]), die indifferenten Narkotica[3]) und die Aldehyde[4]) einem eingehenden Studium unterzogen.

Wir hatten die Beobachtung gemacht, daß für all diese Faktoren ein enger Parallelismus zwischen der zerstörenden Wirkung auf die Oxydone und der chemischen oder physikalischen Veränderung der Eiweißkörper, speziell der Nucleoproteide, zu verzeichnen ist.

Wir hatten hieraus gefolgert, daß die Oxydone aus Eiweißkörpern bestehen oder in enger Beziehung zu den Eiweißkörpern stehen. Doch konnte die Wirkung dieser verschiedenen Faktoren auch durch andere Hypothesen erklärt werden, z. B. durch eine Veränderung der Zellstruktur. Nach Vernon[5]) bewirken die indifferenten Narkotica die Zerstörung des Phenylendiaminoxydons dadurch, daß sie die Lipoidmembranen, die in der Zelle die oxydierenden Fermente zusammenhalten, vernichten.

Wir sahen uns deshalb veranlaßt, das Studium der Wirkung der verschiedenen Faktoren auf die stabilen Oxydone wieder aufzunehmen, wobei wir die verschiedenen Faktoren auf die wässerigen Lösungen dieser Oxydone einwirken ließen.

Die Deutung der Resultate wird infolgedessen klarer sein als in unseren früheren Untersuchungen, wo die Oxydone in den Zellen eingeschlossen waren.

Die wässerigen Lösungen sind aus den Muskeln und hauptsächlich aus dem Herzen des Pferdes und des Rindes nach dem in den vorhergehenden Kapiteln angegebenen Verfahren hergestellt worden.

Einfluß der Temperatur. In unseren früheren Ver-

---

[1]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. **30**, 172, 1910. — Einfluß verschiedener Faktoren auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe. Ebenda **46**, 343, 1912.

[2]) Battelli und Stern, Wirkung des Trypsins auf die verschiedenen Oxydationsvorgänge in den Tiergeweben. Ebenda **34**, 263, 1911.

[3]) Battelli und Stern, Einfluß der Anaesthetica auf die Oxydone. Ebenda **52**, 226, 1913.

[4]) Battelli und Stern, Einfluß der Aldehyde auf die Oxydone. Ebenda **52**, 253, 1913.

[5]) Vernon, The function of lipoids in tissue respiration and in the activity of oxidases. Journ. of Physiol. **45**, 197, 1912.

suchen hatten wir festgestellt, daß die auf 60° erhitzten Gewebe vollständig die Fähigkeit verlieren, Bernsteinsäure zu oxydieren, und fast vollständig die Fähigkeit einbüßen, p-Phenylendiamin zu oxydieren.

Unsere jetzigen Versuche beziehen sich speziell auf den klaren Auszug der Muskeln und hauptsächlich des Herzens des Pferdes und des Rindes.

Der die Oxydone enthaltende Auszug wird auf die gewünschte Temperatur gebracht und 15 Minuten lang bei dieser Temperatur gelassen. Man läßt hierauf abkühlen, fügt die nötige Menge p-Phenylendiamin oder bernsteinsaures Natrium hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich.

Die hierbei erzielten Resultate sind völlig analog denen unserer früheren Versuche, wo wir die grob zerriebenen Gewebe benutzten, in denen die Mehrzahl der Zellen intakt war. Wir brauchten also nur die Werte hier wiederzugeben, die in unseren früheren Arbeiten angeführt sind. Die auf 55° 15 Minuten lang erhitzten Gewebeauszüge weisen bereits eine deutliche Verminderung ihres Oxydationsvermögens gegenüber Bernsteinsäure und p-Phenylendiamin auf. Erhitzen auf 60° bewirkt eine fast völlige Vernichtung des Succinicoxydons, während das Phenylendiaminoxydon nur zum Teil vernichtet ist; häufig bleibt $^1/_4$ oder $^1/_5$ des ursprünglichen Oxydationsvermögens des Phenylendiaminoxydons zurück.

Einfluß des Trypsins. Das Trypsin vernichtet schnell (im Laufe einer halben Stunde bei 40°) die in den zerriebenen Geweben enthaltenen Oxydone.

In den hierher gehörigen Versuchen haben wir in einigen Fällen den klaren wässerigen Auszug des Pferdeherzens benutzt. In einigen anderen Fällen haben wir das Trypsin auf den durch Behandeln mit Essigsäure gebildeten Niederschlag des Auszuges einwirken gelassen, nach vorheriger Lösung des Niederschlages in alkalischem Wasser. Zu 100 ccm Flüssigkeit setzt man 0,50 g Pankreatin Merck hinzu und läßt diese 30 Minuten bei einer Temperatur von 40° einwirken. Man setzt hierauf die nötige Menge p-Phenylendiamin oder Bernsteinsäure hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich. Selbstverständlich untersucht man gleichzeitig die oxydierende Wirkung der nicht vorbehandelten Auszüge.

Die hierbei erzielten Resultate gleichen völlig den Resultaten, die wir in unseren früheren an dem Gewebebrei angestellten Versuchen verzeichnet haben, doch ist die Wirkung des Trypsins auf die Extrakte noch energischer als auf den einfach zerkleinerten Muskel.

Gegenüber der zerstörenden Wirkung des Trypsins ist das Succinicoxydon des Pferdeherzens weniger resistent als das Phenylendiaminoxydon. Der mit 0,50 g Pankreatin Merck $^1/_2$ Stunde lang in Kontakt gelassene Auszug weist fast keine Oxydationswirkung auf Bernsteinsäure auf, während das Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin bloß auf $^1/_3$ oder $^1/_4$ reduziert ist. Wir haben soeben gesehen, daß das Succinicoxydon des Pferdeherzens auch der Temperatur gegenüber empfindlicher ist als das Phenylendiaminoxydon.

Wirkung der indifferenten Narkotica. Die indifferenten Narkotica üben keinen merklichen Einfluß auf die Oxydone der Gewebe aus, wenn ihre Konzentration nicht genügend stark ist. Wenn die Konzentration der Narkotica einen gewissen Wert erreicht, erleiden die Oxydone je nach der Konzentrationsstärke eine teilweise oder eine völlige irreversible Vernichtung.

Wir haben gezeigt, daß für die Mehrzahl der Anaesthetica die Konzentrationen, die nötig sind, um eine völlige irreversible Vernichtung der Oxydone der Gewebe herbeizuführen, dieselben sind wie die zur völligen Fällung der Nucleoproteide der Gewebeauszüge erforderlichen.

In den früheren Versuchen hatten wir hauptsächlich die Muskeln benutzt, die den Vorteil bieten, daß man sie wiederholt auswaschen kann, ohne ihre stabilen Oxydone anzugreifen. Es war auf diese Weise leicht, durch wiederholtes energisches Waschen die Muskeln von den zugesetzten Anaesthetica fast völlig zu befreien und hiermit die Kontaktwirkung der letzteren auszuschalten.

Bei Benutzung der wässerigen Auszüge der Gewebe (Muskeln oder Herz) kann natürlich das Anaestheticum nicht leicht wieder entfernt werden. Wir haben uns daher damit begnügen müssen, das Reaktionsgemisch, bestehend aus dem Extrakte und dem zu untersuchenden Anaestheticum, nach einer bestimmten Einwirkungsdauer zu verdünnen. Um eine zu große Verdünnung zu

vermeiden, haben wir vorerst die Oxydone durch Fällung der Auszüge mit Essigsäure und nachfolgendes Zentrifugieren möglichst konzentriert. Der entstehende Niederschlag wird in einer geringen Menge leicht alkalischen Wassers gelöst, so daß das Gesamtvolumen 5- bis 6 mal kleiner ist als das ursprüngliche Volumen des Auszuges. Man fügt nun das zu untersuchende Anaestheticum hinzu und läßt bei 18° oder 40° 15 Minuten lang in Kontakt. Hierauf fügt man die nötige Menge Wasser hinzu, um das Ganze 4- oder 5 fach zu verdünnen, so daß das ursprüngliche Volumen des Extraktes erreicht wird. Man fügt die nötige Menge Bernsteinsäure oder p-Phenylendiamin hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich.

Die hierbei erzielten Resultate entsprechen vollkommen denjenigen, die wir bei Benutzung der zerriebenen Gewebe verzeichnet hatten. Solange das Anaestheticum eine bestimmte Konzentration nicht erreicht hat, bleibt es ohne Einfluß auf die Wirkung der Oxydone in wässeriger Lösung; außerdem ist die Konzentration, die die Oxydone völlig vernichtet, ziemlich nahe derjenigen, die eine Verminderung um 20% oder 25% der Wirkung der Oxydone hervorruft. Die Werte dieser verschiedenen Konzentrationen sind ziemlich die gleichen wie die bei Benutzung der zerriebenen Gewebe verzeichneten.

Wir brauchen also nur auf die in unseren früheren Arbeiten veröffentlichten Zahlen zu verweisen.

Die Hypothese von Vernon, wonach die Anaesthetica die Oxydone durch Veränderung der physikalischen Struktur der Zellen vernichten, kann folglich nicht mehr aufrecht erhalten werden, und andererseits bieten diese Resultate eine Stütze für unsere Auffassung, daß die Oxydone aus Eiweißsubstanzen bestehen oder daß sie in sehr enger Beziehung zu den Eiweißkörpern stehen.

VII. Einfluß des Zerreibens auf die labilen Oxydone.

Zu den labilen Oxydonen gehört das Citricoxydon, das die Fähigkeit besitzt, nicht nur die Citronensäure, sondern auch die Apfel- und Fumarsäure vollständig zu Wasser und Kohlensäure zu verbrennen.

Dieses Oxydon wird zerstört, wenn man das Gewebe einer längeren Behandlung mit Wasser unterwirft. Es genügt z. B.,

das in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerriebene Gewebe $^1/_2$ Stunde lang mit dem 3fachen Volumen Wasser in Kontakt zu lassen, um das Citricoxydon fast völlig zu vernichten. Die Vernichtung geht desto schneller vor sich, je höher die Temperatur des Wassers ist.

Es steht also zu erwarten, daß die Versuche, das Citricoxydon in wässeriger Lösung zu erhalten, große Schwierigkeiten bieten und daß die Resultate nicht günstig sein können.

In den zu diesem Zweck angestellten Versuchen wurden die Gewebe so schnell wie möglich nach dem Tode des Tieres benutzt, da das Citricoxydon sehr bald nach dem Tode des Tieres in den Geweben abnimmt, wie wir bereits gesagt haben. Die verschiedenen Manipulationen werden bei sehr niedriger Temperatur ausgeführt.

Wir haben als Ausgangsmaterial die Muskeln des Rindes oder des Pferdes, die Leber des Hundes und die Niere des Rindes benutzt. Nach Zerkleinern der Gewebe in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine werden die Gewebe in die Borrelsche Mühle gebracht, in einigen Fällen ohne jede Vorbehandlung, in anderen Fällen nach vorherigem Waschen mit dem 2- oder 3fachen Volumen Wasser.

Nach dem Zerreiben in der Borrelschen Mühle wird der Gewebebrei in zwei gleiche Teile geteilt. Zu dem einen Teile setzt man das 3fache Volumen Wasser und sorgfältig neutralisierte Citronensäure im Verhältnis von 0,40 g für je 30 g Gewebe und 90 ccm Wasser zu. Der andere Teil, der die eigentliche Atmung des Gewebes angeben soll, wird in derselben Weise behandelt, aber ohne Zusatz von Citronensäure. Die beiden Reaktionsgemische werden bei 40° in einer Sauerstoffatmosphäre 30 Minuten lang energisch geschüttelt. Am Schlusse des Versuches bestimmt man die Mengen des aufgenommenen Sauerstoffs und der produzierten Kohlensäure. Wenn diese Mengen in dem die Citronensäure enthaltenden Reaktionsgemisch größer sind als in dem andern, so kann man hieraus folgern, daß ein Teil der zugesetzten Citronensäure oxydiert worden ist, d. h. daß in dem Präparate noch Citricoxydon enthalten ist. Eine gesteigerte Kohlensäurebildung allein genügt nicht, um auf eine Oxydation der Citronensäure zu schließen, wenn es sich um die Leber, die Niere usw. handelt, da diese

Gewebe die Fähigkeit besitzen, die Citronensäure unter Kohlensäurebildung auch ohne Sauerstoffaufnahme zu zersetzen.

Um entscheiden zu können, ob das Citricoxydon durch das Zerreiben in der Borrelschen Mühle abgeschwächt worden ist, muß man natürlich gleichzeitig das Oxydationsvermögen gegenüber der Citronensäure in einem anderen Teile desselben Gewebes untersuchen. Dieser Teil wird in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerrieben, während der ganzen Dauer der Manipulationen an der Luft gelassen und hierauf in derselben Weise behandelt wie das in der Borrelschen Mühle zerriebene Gewebe.

In der folgenden Tabelle IV stellen wir die Resultate einiger typischen Versuche zusammen. Wir geben hier bloß die durch Zusatz von Citronensäure bewirkte Steigerung der Sauerstoffaufnahme an.

Tabelle IV.

Oxydation der Citronensäure durch die verschiedenen Gewebe.

Die Werte bezeichnen in Kubikzentimetern die Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch Zusatz von Citronensäure zu 100 g Gewebe. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten. Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme wird durch ein +-Zeichen angegeben.

Gewebe	Zerkleinerungsapparat	Aufgenommener Sauerstoff ccm
Muskel vom Rind	Fleischhackmaschine	+ 37
	Borrelsche Mühle 30″	+ 10
	„ „ 60″	+ 3
Muskelrückstand vom Rind	Fleischhackmaschine	+ 22
	Borrelsche Mühle 30″	+ 6
	„ „ 60″	+ 0
Leber vom Hund	Fleischhackmaschine	+ 31
	Borrelsche Mühle 30″	+ 11
	„ „ 60″	+ 2
Niere vom Rind	Fleischhackmaschine	+ 20
	Borrelsche Mühle 30″	+ 6
	„ „ 60″	+ 0

Aus den Versuchsresultaten der Tabelle IV ersieht man, daß selbst ein kurzdauerndes Zerreiben der Gewebe auf das Citricoxydon eine sehr ungünstige Wirkung ausübt. In der Mehrzahl der Fälle wird dieses Oxydon durch Zerreiben des Gewebes während 1 Minute vollständig vernichtet, obgleich in diesem Falle die Zerstörung der Zellstruktur eine sehr unvollkommene ist.

Selbstverständlich gelang es uns nicht bei der großen Labilität des Citricoxydons, einen klaren wässerigen Auszug herzustellen, der imstande wäre, die Citronensäure merklich zu oxydieren.

Es muß außerdem bemerkt werden, daß auch in den Kontrollproben der Gewebe, die in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinert waren, die durch Zusatz von Citronensäure bewirkte Steigerung der Sauerstoffaufnahme verhältnismäßig gering war, wenn man sie mit den Werten vergleicht, die wir in unseren früheren Versuchen verzeichnen konnten. Das an der Luft stehen gelassene zerriebene Gewebe, das als Kontrolle dienen sollte, verliert eben sehr bald einen mehr oder minder großen Teil seines Oxydationsvermögens gegenüber der Citronensäure.

VIII. Einfluß des Zerreibens auf die Hauptatmung.

In unseren früheren Untersuchungen, betreffend die Hauptatmung der isolierten Tiergewebe, wurden die zu untersuchenden Gewebe einer Zerkleinerung in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine unterworfen. Gleich im Anfang unserer Untersuchungen hatten wir die Beobachtung gemacht, daß der Grad der Zerkleinerung einen merklichen Einfluß auf die Atmungstätigkeit ausübte, und insbesondere, daß längeres Zerreiben eine große Verminderung der Intensität des Gaswechsels zur Folge hatte. Aus eben diesem Grunde hatten wir eine gewöhnliche Fleischhackmaschine gewählt, um eine schnelle Zerkleinerung des Gewebes zu erzielen, was bei Benutzung eines Mörsers nicht möglich gewesen wäre.

Ähnliche Beobachtungen sind von Thunberg[1]) an Froschmuskeln gemacht worden. Er fand, daß Zerreiben des Muskels in einem Mörser mit Kieselguhr oder mit zerstampftem Glas mehr als die Hälfte des Gaswechsels vernichtet, obgleich das Zerreiben bei sehr niedriger Temperatur ausgeführt wurde.

Harden und Maclean[2]) beobachten ebenfalls eine starke

---

[1]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. Skand. Arch. f. Physiol. 22, 406, 1909.

[2]) Harden and Maclean, The oxidation of isolated animal tissues. Journ. of Physiol. 43, 34, 1911.

Verminderung des Gaswechsels des Kaninchenmuskels nach energischem Zerreiben desselben mit Sand.

Warburg[1]) fand, daß die roten Blutkörperchen nach völliger Zerstörung der Struktur des Stroma keine Sauerstoffaufnahme mehr aufweisen, während einfaches Lösen der Blutkörperchen, wobei das Stroma unverändert bleibt, keine Schädigung des Gaswechsels zur Folge hatte.

Andererseits haben wir in einer früheren Arbeit[2]) darauf hingewiesen, daß unter dem Einflusse der verschiedenen Faktoren die Hauptatmung ungefähr gleichzeitig mit dem Citricoxydon herabgesetzt wird und verschwindet. Wir könnten hier wiederholen, was wir im vorhergehenden Abschnitte über das Citricoxydon gesagt haben. Es steht also zu erwarten, daß die Versuche, das Gewebe energisch zu zerreiben, für die Hauptatmung ungünstige Resultate liefern werden.

Diese Versuche sind an dem Zwerchfell des Rindes oder des Pferdes, der Niere des Rindes und der Leber des Hundes ausgeführt worden, die sich für die Versuche über die Hauptatmung besonders gut eignen. Diese Gewebe sind so frisch wie möglich benutzt worden und die verschiedenen Manipulationen bei sehr niedriger Temperatur ausgeführt worden.

Nach vorherigem Zerreiben in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine wird das Gewebe mit $^1/_3$ Volumen leicht alkalischen Wassers versetzt und in zwei Teile geteilt. Ein Teil wird in der Borrelschen Mühle mehr oder minder lange zerrieben, während der andere Teil die ganze Zeit hindurch an der Luft stehen gelassen wird. Dieser letzte Teil dient als Kontrolle. Zu jedem dieser Teile fügt man 3 Volumen einer Dinatriumphosphatlösung in einer Gesamtkonzentration von 5:1000 hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich. Am Schlusse des Versuches bestimmt man die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs und der produzierten Kohlensäure.

In einer großen Anzahl dieser Versuche haben wir zu den zerriebenen Geweben Pnein in Form des wässerigen Muskelextrakts hinzugesetzt. Wie wir in früheren Untersuchungen

---

[1]) Warburg, Über Beziehungen zwischen Zellstruktur und biochemischer Reaktion. Arch. f. d. ges. Physiol. **145**, 277, 1912.

[2]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Citronen-, Äpfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. **31**, 478, 1911.

gezeigt haben, steigert das Pnein bedeutend die Hauptatmung, wenn diese aus irgendeinem Grunde vermindert war. In den Versuchen, in denen wir das Pnein benutzten, war die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches folgende: zerriebenes Gewebe 30 g, 1 %ige Dinatriumphosphatlösung 45 ccm, wässeriger Auszug des Rindermuskels 45 ccm.

In der Tabelle V stellen wir die Resultate einiger typischer Versuche zusammen.

Tabelle V.

Sauerstoffaufnahme und Kohlensäurebildung durch 100 g Gewebe nach Zerkleinern in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine oder nach Zerreiben in der Borrelschen Mühle. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten.

Gewebe	Zerkleinerungsapparat	Flüssigkeit	Aufgenommener O_2 ccm	Entwickelte CO_2 ccm
Muskel vom Rind	Fleischhackmaschine	Muskelauszug	130	112
	Borrelsche Mühle 1′	„	80	70
	„ „ 2′	„	55	48
	„ „ 3′	„	45	40
Muskelrückstand vom Rind	Fleischhackmaschine	Salzlösung	27	24
	„	Muskelauszug	100	85
	Borrelsche Mühle 1′	Salzlösung	13	11
	„ „ 1′	Muskelauszug	70	63
Muskel vom Hnnd	Fleischhackmaschine	„	85	78
	Borrelsche Mühle 1′	„	63	58
	„ „ 2′	„	46	42
	„ „ 5′	„	27	21
Leber vom Huud	Fleischhackmaschine	Salzlösung	70	65
	„	Muskelauszug	110	100
	Borrelsche Mühle 1′	Salzlösung	55	48
	„ „ 1′	Muskelauszug	70	63
	„ „ 2′	Salzlösung	45	40
	„ „ 2′	Muskelauszug	55	50
Niere vom Rind	Fleischhackmaschine	Salzlösung	75	68
	„	Muskelauszug	133	115
	Borrelsche Mühle 1′	Salzlösung	40	35
	„ „ 1′	Muskelauszug	78	70
	„ „ 2′	Salzlösung	35	30
	„ „ 2′	Muskelauszug	45	39

Die in der vorhergehenden Tabelle angeführten Versuchs ergebnisse zeigen, wie zu erwarten war, daß das Zerreiben selbst während einer relativ kurzen Dauer eine bedeutende Verminderung der Intensität der Hauptatmung der Gewebe bewirkt. So

sieht man, daß nach einem 1 Minute langen Zerreiben in der Borrelschen Mühle der Gaswechsel des Muskels, der nur die Hauptatmung besitzt, um die Hälfte und noch mehr vermindert ist. Beträgt die Dauer des Zerreibens 2 bis 3 Minuten, so ist die Verminderung noch stärker.

Das 2 Minuten lang in der Borrelschen Mühle zerriebene Muskelgewebe ist sehr stark dissoziiert aber es enthält noch eine ziemlich große Menge von Faserfragmenten. Wir haben versucht, festzustellen, ob zwischen der Menge dieser Fragmente und der Intensität des Gaswechsels eine Beziehung besteht. Es schien uns, daß die Menge dieser Faserfragmente sehr klein ist im Vergleich zu der Intensität der Atmung, die das zerriebene Gewebe noch aufweist. Doch ist es sehr schwer, in etwas präziserer Form festzustellen, wie groß die Menge dieser Fragmente ist, die in bezug auf ihr Volumen und ihre Intaktheit natürlich sehr verschieden sein können.

Die Versuchsergebnisse der Tabelle V zeigen auch sehr deutlich, daß die günstige Wirkung des Pneins auch bei den in der Borrelschen Mühle zerriebenen Geweben zur Geltung kommt.

Außerdem ist zu bemerken, daß in den in dieser Tabelle angeführten Versuchen die Intensität der Hauptatmung in den Kontrollproben viel niedriger ist als in unseren früheren Versuchen. Diese Abschwächung der Atmungsenergie rührt davon her, daß das in der gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerriebene Gewebe während einer mehr oder minder langen Zeit an der Luft stehen gelassen wurde, und bekanntlich nimmt die Hauptatmung in den zerriebenen Geweben sehr schnell ab.

Vergleicht man die in der Tabelle V zusammengestellten Resultate mit den Resultaten des vorigen Abschnitts, so bemerkt man, daß die Hauptatmung gegen das Zerreiben eine größere Resistenz aufweist als das Citricoxydon. Wir haben in der Tat gesehen, daß das letztere durch ein 1 Minute langes Zerreiben in der Borrelschen Mühle völlig vernichtet wird.

Diese hier angeführten Versuchsergebnisse gestatten nicht, mit Sicherheit zu entscheiden, auf welche Ursache die Vernichtung der Hauptatmung bei längerem Zerreiben der Gewebe zurückzuführen ist. Mehrere Möglichkeiten können in Betracht kommen, von denen wir hier die drei wichtigsten erwähnen wollen.

Man kann erstens die Annahme machen, daß infolge der Vernichtung der Zellstruktur die aktiven Agentien der Hauptatmung in intimeren Kontakt mit den schädigenden Faktoren kommen. Diese Faktoren bewirken bereits unter normalen Verhältnissen, obgleich langsamer, das Verschwinden der Hauptatmung nach dem Tode des Tieres.

Zweitens kann man eine schädigende Wirkung des Wassers annehmen. Läßt man z. B. ein in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinertes Gewebe einige Minuten lang im Kontakt mit gewöhnlichem Wasser oder einer Salzlösung, so verliert es die Hauptatmung. Nach Zerstörung der Zellen könnten die aktiven Agentien in engere Berührung mit dem Wasser kommen.

Schließlich kann man auch annehmen, daß der Verlust der Hauptatmung durch die Zerstörung der physikalischen Zellstruktur bedingt sei.

Bis jetzt besitzen wir kein genügendes Tatsachenmaterial, um zu einer definitiven begründeten Schlußfolgerung zu gelangen. Doch scheint uns, wie wir bereits gesagt haben, daß die Verminderung der Atmungstätigkeit durchaus in keiner direkten Beziehung zur Anzahl der Zellen, deren physikalische Struktur vernichtet ist, steht.

IX. Extraktion der aktiven Körper der Hauptatmung durch Wasser.

Bei der großen Labilität der Hauptatmung kann man natürlich kaum erwarten, wässerige Gewebeauszüge bereiten zu können, die in höherem Grade diese Atmungstätigkeit aufweisen.

In den hierhergehörigen Versuchen haben wir ausschließlich die Muskeln des Rindes und des Pferdes benutzt, da in diesen Geweben bloß die Hauptatmung existiert. Die Leber und die Niere eignen sich weniger gut, weil sie außer der Hauptatmung auch die akzessorische Atmung aufweisen, welch letztere die Hauptatmung, die in den wässerigen Auszügen nur sehr gering sein kann, maskieren könnte. Das Gewebe wird so frisch wie möglich in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 1/3 Volumen sehr kalten, leicht alkalischen Wassers versetzt und 2 oder 3 Minuten lang in der Borrelschen Mühle zerrieben. Der auf diese Weise bereitete Gewebebrei

wird mit dem dreifachen Volumen leicht alkalischen Wassers versetzt und schnell zentrifugiert.

Man erhält beim Zentrifugieren drei Schichten: eine untere Schicht, die aus Fasern und Zellfragmenten besteht, eine mittlere körnige Schicht und eine obere flüssige Schicht. Das Zentrifugieren konnte nicht lange fortgesetzt werden, da dies eine völlige Vernichtung der Hauptatmung zur Folge haben würde. Aus dem Grunde ist die überstehende Flüssigkeit nicht klar genug, sondern mehr oder weniger trübe. Doch läßt sich bei der mikroskopischen Untersuchnng keine Spur morphologischer Struktur unterscheiden.

Dieser flüssige Teil wird mit Dinatriumphosphat in einer Konzentration von 5 : 1000 versetzt und bei 40° in einer Sauerstoffatmosphäre energisch geschüttelt. Der hierbei verzeichnete Gaswechsel ist sehr gering, doch nicht unmerklich.

So findet man z. B., daß der auf die soeben besprochene Weise hergestellte wässerige Auszug, entsprechend 100 g Muskeln (von Rind oder Pferd), die in der Borrelschen Mühle 3 Minuten lang zerrieben wurden, 15 bis 20 ccm Sauerstoff aufnimmt und 12 bis 16 ccm Kohlensäure bildet.

Aus diesen Resultaten lassen sich natürlich keine Schlüsse auf die Natur der Hauptatmung ziehen.

X. Einfluß des Zerreibens auf die Oxydasen (Uricoxydase und Alkoholoxydase) und die akzessorische Atmung.

Im Gegensatz zu den Oxydonen gehen die Oxydasen leicht in den wässerigen Auszug der Tiergewebe über. Es genügt, das in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerriebene Gewebe mit Wasser oder einer Salzlösung zu behandeln, um einen an Oxydasen reichen Auszug zu erhalten, falls das benutzte Gewebe solche enthält. Andererseits können die Oxydasen in Pulverform dargestellt werden durch Behandeln der Gewebe mit Alkohol oder Aceton. Die in diesem Gewebepulver enthaltenen Oxydasen können hernach mit Wasser extrahiert werden.

Die akzessorische Atmung weist dieselben Eigentümlichkeiten auf, wie die soeben für die Oxydasen erwähnten. Die wässerigen Auszüge der Leber, der Niere usw. können einen recht hohen Gaswechsel aufweisen, und das gleiche gilt auch für die mit Alkohol oder Aceton behandelten Gewebe, die eine

energische akzessorische Atmung aufweisen. Aus diesem Grunde ist man berechtigt, die akzessorische Atmung als eine Oxydasenatmung, d. h. als eine durch Oxydasen bewirkte Atmung, aufzufassen. Doch wissen wir bis jetzt noch nicht, um welche Oxydasen es sich hier handelt, d. h. auf welche Substanzen diese Fermente wirken.

Da nun die Oxydasen und die aktiven Agentien der akzessorischen Atmung leicht aus den Zellen in den wässerigen Auszug übergehen, so folgt hieraus, daß es nicht nötig ist, die Gewebe in der Borrelschen Mühle zu zerreiben, um zu beweisen, daß die Oxydasen und die akzessorische Atmung von der Zellstruktur unabhängig sind.

Doch haben wir die Oxydasenmenge in dem wässerigen Auszug der Gewebe nach Zerkleinern derselben in der gewöhnlichen Fleischhackmaschine mit der Oxydasenmenge des Auszuges der in der Borrelschen Mühle zerriebenen Gewebe zu vergleichen versucht, um zu sehen, ob die Extraktion nach gewöhnlicher Zerkleinerung des Gewebes eine vollständige ist.

Unter den Oxydasen haben wir zu diesen Versuchen die Uricoxydase und die Alkoholoxydase gewählt, die unter allen in den Geweben der höheren Tiere enthaltenen Oxydasen die größte Oxydationsenergie aufweisen. Diese Oxydasen finden sich hauptsächlich in der Leber und der Niere der verschiedenen Tiere, sie fehlen in gewissen Geweben, wie z. B. den Muskeln. Dasselbe gilt für die akzessorische Atmung. Aus diesem Grunde haben wir in den hierhergehörigen Versuchen die Leber und die Niere der verschiedenen Tiere benutzt.

Das vorerst in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinerte Gewebe wird mit $^1/_3$ Volumen einer Natriumhydratlösung 1:2000 versetzt und in zwei Teile geteilt. Ein Teil wird in der Borrelschen Mühle mehr oder weniger lange zerzieben, während der andere Teil unterdessen an der Luft gelassen wird. Zu einem jeden dieser Teile fügt man 3 Volumen sehr kalten, leicht alkalischen Wassers (NaOH 1:5000) hinzu und läßt 5 bis 10 Minuten unter wiederholtem Umschütteln in Kontakt. Man zentrifugiert darauf 5 bis 10 Minuten und hebt die überstehende flüssige Schicht vorsichtig ab.

Bei der Untersuchung der akzessorischen Atmung wird die Flüssigkeit in mit Sauerstoff gefüllte Flaschen gebracht und

wie gewöhnlich bei 40° energisch geschüttelt. Am Schlusse des Versuches bestimmt man die Menge des aufgenommenen Sauerstoffes und der produzierten Kohlensäure.

Wenn es sich um die Untersuchung der Alkoholoxydase handelt, so setzt man zu der abgehobenen Flüssigkeit 0,30 g Äthylalkohol für je 100 ccm Gewebeauszug hinzu und die nötige Menge NH_3 oder NaOH, um die optimale Alkalinität zu erzielen, und verfährt im übrigen wie sonst. Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme nach Zusatz von Alkohol zeigt die Intensität der Oxydationswirkung der Alkoholoxydase an.

Bei der Untersuchung der Uricoxydase fügt man zu der abgehobenen Flüssigkeit harnsaures Natrium (0,30 g Natriumurat für 100 ccm Gewebeauszug) und die nötige Menge NaOH oder NH_3 hinzu und verfährt in der üblichen Weise. Aus der Steigerung der Kohlensäurebildung nach Zusatz von Harnsäure berechnet man die Intensität der Harnsäureoxydation durch die Uricoxydase.

Wir haben bemerkt, daß die Intensität der akzessorischen Atmung sowie der Oxydation des Alkohols und der Harnsäure in den wie gewöhnlich bereiteten Extrakten ungefähr die gleiche ist wie in den Extrakten der in der Borrelschen Mühle 2 bis 3 Minuten lang zerriebenen Gewebe. Dieses Resultat beweist, daß die Oxydasen und die aktiven Körper der akzessorischen Atmung nach einfacher Zerkleinerung in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine, zu einer Zeit also, wo die Mehrzahl der Zellen ihre Struktur noch bewahrt haben, vollständig in den wässerigen Auszug übergehen.

Als Beispiel führen wir hier einige Werte an, die den in unseren früheren Arbeiten verzeichneten analog sind.

300 ccm wässerigen Leberauszuges von Pferd, Rind oder Hammel, entsprechend 100 g Gewebe, weisen bei einer Schütteldauer von 30 Minuten durchschnittlich eine Sauerstoffaufnahme von 42 ccm und eine Kohlensäurebildung von 28 ccm.

300 ccm Leberauszug vom Pferd oxydierten unter den gleichen Bedingungen 0,11 g Äthylalkohol.

300 ccm Leberauszug vom Pferd oxydierten im Durchschnitt 0,6 g Harnsäure.

Außer in den Auszügen haben wir die Intensität der akzessorischen Atmung, sowie der Oxydation des Alkohols und

der Harnsäure der in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinerten Gewebe mit der in der Borrelschen Mühle zerriebener Gewebe verglichen.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß in einigen Fällen die akzessorische Atmung ebenso wie die Oxydation des Alkohols und der Harnsäure in den in der Borrellschen Mühle zerriebenen Geweben deutlich herabgesetzt waren. In einigen Fällen waren diese Werte um die Hälfte vermindert, in anderen Fällen war hingegen keine Verminderung zu verzeichnen.

Die Ursache dieser Unbeständigkeit der Resultate kennen wir einstweilen nicht.

Es ist selbstverständlich, daß in den Fällen, wo das Gewebe durch das Zerreiben in der Borrelschen Mühle eine Verminderung seines Oxydationsvermögens erlitten hatte, die aus dem so behandelten Gewebe hergestellten wässerigen Auszüge ebenfalls ein geringeres Oxydationsvermögen aufwiesen als die aus in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinerten Geweben bereiteten.

XI. Unterscheidungsmerkmale zwischen den Oxydasen und den Oxydonen.

Als eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen den Oxydasen und den Oxydonen hatten wir bisher die Löslichkeit in Wasser betrachtet. Auf Grund unserer ersten Untersuchungen hatten wir geschlossen, daß die Oxydone in Wasser unlöslich seien. Wir haben aber nun gesehen, daß die Oxydone ebensogut wie die Oxydasen in Wasser löslich sind. Infolgedessen verschwindet dieses wichtige Unterscheidungsmerkmal zwischen Oxydasen und Oxydonen.

Die verschiedenen Resultate unserer bisherigen Untersuchungen zusammenfassend, können wir jetzt sagen, daß die wichtigsten Eigentümlichkeiten, die die Oxydone von den Oxydasen unterscheiden, die folgenden sind:

Die Oxydasen (wie z. B. die Alkoholoxydase, die Uricoxydase u. a.) gehen leicht durch die Zellmembranen der dissoziierten Gewebe durch und lösen sich in Wasser. Die Oxydone passieren die intakten Zellmembranen nicht und gehen erst nach vorheriger Zerstörung der Zellstruktur in Lösung in Wasser. Man kann den in der gewöhnlichen Fleischhack-

maschine zerriebenen Muskel oder das Herz unzählige Male mit Wasser waschen, ohne die Menge der Oxydone in dem Rückstande merklich zu verringern. Aber nach mechanischer Zerstörung der Zellstruktur der Muskeln und besonders des Herzens erhält man klare Auszüge, die sehr reich an stabilen Oxydonen sind.

Die Oxydone bestehen aus Proteinkörpern, die den Nucleoproteiden nahestehen, oder sie stehen in enger Beziehung zu diesen Substanzen. Für die Eiweißnatur der Oxydasen liegt aber bis jetzt kein einziger Beweis vor.

Die Folge der Eiweißnatur der Oxydone sind mehrere Eigentümlichkeiten, die den Oxydasen abgehen.

Die Oxydone werden sehr schnell durch Trypsin vernichtet, während die Oxydasen durch dieses Ferment nicht verändert werden, selbst nach einer Einwirkung von mehreren Stunden.

Die indifferenten Anaesthetica bewirken eine irreversible Vernichtung der Oxydone in der gleichen Konzentration wie die zur Fällung der Nucleoproteide nötigen. Die Oxydasen widerstehen der Behandlung mit dem mehrfachen Volumen Alkohol, Aceton usw.

Ein anderer deutlicher Unterschied zwischen den Oxydasen und den Oxydonen ist ihr Verhalten gegen die Temperatur. Das Temperaturoptimum für die Wirkung der Oxydone ist ungefähr 40°, während das Optimum für die Oxydasen bei ungefähr 55° liegt. Außerdem werden die Oxydasen durch Erhitzen der Gewebe oder der Gewebeauszüge während 15 Minuten auf 60° nur wenig abgeschwächt. Unter den gleichen Bedingungen bewirkt eine Temperatur von 55° keine merkliche Veränderung. Die Oxydone hingegen werden bereits bei 55° abgeschwächt und bei 60° vollständig oder nahezu gänzlich vernichtet.

Man kann schließlich noch hinzufügen, daß die Oxydone in mehr oder minder großer Menge in allen Geweben der höheren Tiere vorkommen, während die bisher bekannten Oxydasen nur auf bestimmte Gewebe und namentlich auf die Drüsen beschränkt sind.

XII. Experimentelle Ergebnisse.

Die mechanische Zerstörung der physikalischen Zellstruktur mit Hilfe der Borrelschen Mühle hat in bezug auf die ver-

schiedenen Oxydationsprozesse der Tiergewebe zu folgenden Resultaten geführt.

1. Das Phenylendiaminoxydon der verschiedenen Gewebe bleibt nach völliger Zerstörung der Zellen intakt.

2. Das Succinicoxydon bleibt in mehreren Geweben (Muskeln, Herz, Niere) intakt, während es in der Leber mehrerer Tiere eine mehr oder minder bedeutende Abschwächung erfährt. Das fein zerriebene Gummi übt auf die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe eine sehr stark hemmende Wirkung aus.

3. Die stabilen Oxydone (das Succinicoxydon und das Phenylendiaminoxydon), die aus den Geweben nicht extrahiert werden können, solange die Zellen ihre Struktur bewahren, gehen nach Zerstörung der Zellstruktur in leicht alkalisches Wasser in Lösung.

Die Muskeln und namentlich das Herz liefern klare und sehr aktive Lösungen stabiler Oxydone.

4. Die stabilen Oxydone werden aus ihren Lösungen durch verdünnte Essigsäure ohne Schädigung gefällt. Der Niederschlag wird durch leichtes Alkalinisieren wieder gelöst.

5. In wässeriger Lösung zeigen die stabilen Oxydone gegenüber den verschiedenen Agentien ganz das gleiche Verhalten wie die noch im Zellinnern enthaltenen Oxydone.

Eine Temperatur von 60° vernichtet das Succinicoxydon und schwächt das Phenylendiaminoxydon sehr bedeutend.

Das Trypsin vernichtet die beiden Oxydone schnell.

Die beiden Oxydone erleiden eine irreversible Zerstörung unter dem Einflusse der indifferenten Anaesthetica in relativ schwacher Konzentration.

6. Unsere Behauptung, daß die Oxydone aus Eiweißkörpern bestehen und in keiner Beziehung zu den Lipoiden stehen, wird bekräftigt.

7. Das labile Citricoxydon wird bei der mechanischen Zerstörung der Zellen sehr schnell vernichtet.

8. Die Hauptatmung wird ebenfalls während der Manipulationen der mechanischen Zerstörung der Zellstruktur vernichtet. Doch ist die Widerstandsfähigkeit der Hauptatmung bedeutend größer als die des Citricoxydons.

9. Nach weitgehender mechanischer Zerstörung der Zellstruktur scheint die Intensität der Hauptatmung in keinem Verhältnis zu stehen zu der Zahl der übrig gebliebenen Zellen oder Zellfragmenten, sondern sie scheint größer zu sein.

Dieses Resultat spricht gegen die Idee, daß die Hauptatmung von der Zellstruktur abhängt.

10. Bei der großen Abschwächung der Hauptatmung durch die mechanische Zerstörung einer großen Anzahl von Zellen weisen die wässerigen Gewebeauszüge einen nur geringen Gaswechsel auf.

11. Die aktiven Körper der akzessorischen Atmung und die Oxydasen sind in den nach völliger Zerstörung der Zellstruktur hergestellten wässerigen Auszügen der Gewebe nicht in größerer Menge vorhanden als in den Auszügen der einfach dissoziierten, ihre Zellstruktur noch bewahrenden Gewebe.

Die aktiven Körper der akzessorischen Atmung sowie die Oxydasen passieren also leicht die Zellmembranen, im Gegensatz zu den Oxydonen.

Über die Perspiratio insensibilis unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

G. Galeotti und **N. M. Macri.**

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Kgl. Universität Neapel.)

(Eingegangen am 23. August 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Um die Untersuchungen zu erweitern, die einer von uns vor langer Zeit über den Stoffwechsel des Wassers unternommen hat, dachten wir daran, die durch die Haut bei der sog. Perspiratio insensibilis ausgeschiedene Wassermenge direkt zu bestimmen.

Zu diesem Zwecke wurde ein einfacher Apparat ersonnen, den Dr. G. Viale[1]) auf Anraten des einen von uns zuerst verwendet hat. Er studierte insbesondere die Unterschiede, die bei der Perspiratio insensibilis während des Aufenthaltes auf der Ebene und im Gebirge eintreten. Seine Schlußfolgerungen sind die nachstehenden:

1. Die Perspiratio insensibilis von 1 qdcm Haut (Vorderarm), berechnet in Wassergewicht in 10 Minuten und bei der Temperatur von 10°, beträgt in Turin 14 mg, am Col d'Olen 23 mg.

2. Nimmt man nun an, daß die Verdunstung für die Haut der verschiedenen Körperteile ungefähr die gleiche ist, so wäre der Gesamtverlust auf dem Wege der Haut, ohne Schwitzen, bei der Temperatur von 10°, in Turin 322 g, am Col d'Olen 536 g.

Viale selbst vergleicht die von ihm erhaltenen Zahlen mit denen anderer Autoren. Er sagt: Aus 1 qdcm Haut verdunsten

---

[1]) G. Viale, Atti della Ra Acc. dei Lincei **33**, serie 5a, f. 1, 1914.

in Turin, bei der Durchschnittstemperatur von 10°, im Mittel 14 mg Wasser, d. h. in 24 Stunden, wenn man die Oberfläche des ganzen Körpers zu 1,6 qm berechnet, 322 g Wasser.

Als nützlich erweist sich die Vergleichung dieser Werte mit den schon bekannten: Röhrig fand unter mittleren Temperaturverhältnissen für den ganzen Tag 660 g; Schierbeck bei 18° 317 g und bei 29° 532 g; Nuttall bei 28° 304 g; Wolpert erhielt einen dem Röhrigs ähnlichen Wert; Willebrand fand bei 12° 252 g, bei 16° 366 g, bei 17° 396 g; Osborne fand bei 17° 748 g, Kalmann bei 15 bis 16° im Mittel 821 g; Galeotti und Signorelli fanden in Neapel bei der Durchschnittstemperatur von 18 bis 20° ersterer 946 bis 1690 g, letzterer 719 bis 1079 g.

Die angegebenen Zahlen übersteigen im allgemeinen den von Viale gefundenen Wert; dies erklärt sich aus der höheren Temperatur, bei der die anderen Autoren ihre Versuche anstellten: dagegen wurden im Umkreis der Temperaturen, bei denen Viale experimentierte, mehr übereinstimmende Werte gefunden. Aus den Bestimmungen Viales bei 17° ergab sich eine Abgabe von 398 g, eine Zahl, die vollkommen mit der von Willebrand bei 17° gefundenen, nämlich 396 g, übereinstimmt.

Viale selbst bemerkt dann, daß die Zahlen, welche für die ganze Körperoberfläche aus den für die Gegend des Vorderarmes gefundenen Werten berechnet wurden, mit Vorbehalt aufzunehmen sind, weil man nicht ohne weiteres annehmen kann, daß alle Teile des Körpers, auch ohne Schweißabsonderung, infolge Ausdünstung gleiche Wassermengen ausscheiden.

Bei unseren Versuchen haben wir, wie schon oben angedeutet wurde, die Frage der direkten Bestimmung der Wassermenge, die durch die Haut, ohne Schwitzen, nur bei der Perspiratio insensibilis ausgeschieden wird, wieder aufgenommen; wir bestimmten nämlich die Wassermenge, die durch die Haut hindurchgeht, ohne daß die Schweißdrüsen ihre spezifische Tätigkeit ausüben.

Unsere Versuche sind in drei Gruppen eingeteilt. In einer ersten Gruppe haben wir die Verdunstungsunterschiede festgestellt, welche die verschiedenen Gegenden der Haut derselben Person aufweisen können; in der zweiten bestimmten wir die Wassermengen, die von der Haut verschiedener Personen bei

verschiedenen Temperaturen, stets in der vorderen Gegend des Vorderarmes, ausgeschieden werden, und endlich in der dritten Gruppe die Ausdünstung der Haut bei Fieberkranken.

Untersuchungsmethode.

Der zu unseren Bestimmungen dienende Apparat besteht aus einem rechtwinkligen Metallkästchen, das wie ein photographisches Chassis durch einen verschiebaren Metalldeckel mit Reibung in einer Rinne geöffnet und geschlossen wird. Auf dem Boden des Kästchens sind mosaikartig kleine Calciumchloridblöcke angebracht und mit Paraffin oder Siegellack befestigt.

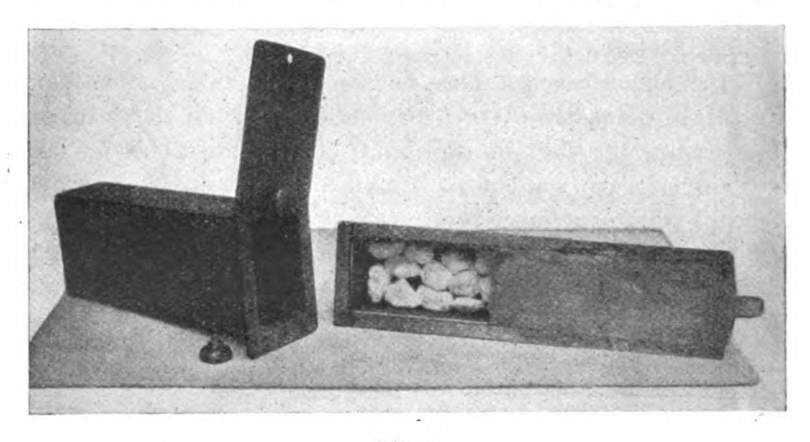


Fig. 1.
Rechts: Das Absorptionskästchen.
Links: Schutzschale für die Aufbewahrung und Wägung des Kästchens.

Das geschlossene Kästchen wird gewogen und nach Abnahme des Deckels schnell auf die Haut gebracht, vermittels eines Riemens befestigt und eine bestimmte Zeit lang dort gelassen; ist diese verflossen, so wird es schnell geschlossen und wieder gewogen. Die Gewichtszunahme drückt die Menge Wasserdampf aus, welche die untersuchte Hautfläche ausgedünstet hat. Da die Größe der Öffnung des Kästchens bekannt ist, läßt sich die in der Zeiteinheit von der Flächeneinheit ausgedünstete Wassermenge berechnen. Dabei wird die Temperatur der Umgebung berücksichtigt. Der Apparat kann an jedem beliebigen Körperteil appliziert werden, vorausgesetzt, daß die Haut ihn vollkommen verschließt.

I. Die Hautverdunstung in den verschiedenen Körperteilen.

Es war vorauszusehen, daß in Anbetracht der verschiedenen Beschaffenheit der Haut, insbesondere ihrer Hornschichten, und der verschiedenen Menge der Schweißdrüsen in den verschiedenen Körpergegenden auch die mit der Perspiratio insensibilis ausgeschiedene Wassermenge einigermaßen variieren mußte. Die Versuche dieser erste Gruppe wurden alle an derselben Person an verschiedenen Tagen während des Monats März bei einer Umgebungstemperatur von 14 bis 15 ^{0} gemacht.

Die Resultate dieser Bestimmungen finden sich in der folgenden Tabelle I, auf der die Zahlen der letzten Kolumne in Grammen die von 1 qdcm Haut während einer Stunde durch die Perspiratio insensibilis ausgeschiedene Wassermenge ausdrücken.

Ordnen wir die verschiedenen Körpergegenden nach der aus ihnen ausdünstenden Wassermenge, so erhalten wir:

Palmare Gegend der Hand . . .	0,601
Seitliche Gegend des Halses . .	0,432
Gegend der Wangen	0,346
Dorsale Gegend der Hand . . .	0,303
Mittlere Gegend der Brust . . .	0,251
Gegend des Rückens	0,229
Hintere Gegend des Vorderarmes	0,167
Gegend der Glutaei	0,165
Äußere Gegend des Schenkels .	0,141
Regio poplitaea	0,123
Vordere Gegend des Vorderarmes	0,116
Innere Gegend des Schenkels . .	0,107
Mittlere Gegend des Bauches . .	0,106

Man sieht also, daß die größere Wasserverdunstung in den Teilen erfolgt, die gewöhnlich unbedeckt bleiben, nämlich am Kopf und an den Händen. Größer als irgendwo anders ist sie an den Handflächen. Auf der Brust und auf dem Rücken ist die insensible Perspiration geringer, aber immerhin etwas größer als an den anderen Körperteilen, in denen übrigens die Verdunstung wenig verschieden ist und um das Mittel von 0,135 g pro Quadratdezimeter und Stunde herum schwankt.

Tabelle I.

Datum	Temperatur d. Umgebung °C	Hautgegend	Im Apparat in 15 Minuten gesammelte Wassermenge g	Von einem Quadratdezimeter Haut in 1 Stunde perspirierte Wassermenge g	Mittel
27. II. 11 a. m.	14,5	Gegend der Wangen	0,0107	0,2870	
11. III. 8³⁰ a. m.	15,5		0,0135	0,3660	
12. 8³⁰ a. m.	15,5		0,0144	0,3901	0,346
18. III. 8 a. m.	16	Seitliche Gegend des Halses	0,0105	0,4208	
19. 8 a. m.	15,5		0,0118	0,4660	
20. 9 a. m.	16		0,0100	0,4100	0,432
27. II. 11 a. m.	14,5	Palmare-Gegend der Hand	0,0250	0,6770	
28. 9 a. m.	14,5		0,0226	0,6120	
13. III. 8³⁰ a. m.	15,5		0,0226	0,6120	
15. 8³⁰ a. m.	16		0,0187	0,5071	0,601
14. III. 8³⁰ a. m.	15,5	Dorsale Gegend der Hand	0,0119	0,3230	
16. 8³⁰ a. m.	16		0,0105	0,2843	0,303
13. III. 8³⁰ a. m.	15,5	Vordere Gegend des Vorderarmes	0,0101	0,1149	
15. 8³⁰ a. m.	16		0,0106	0,1205	
19. 8 a. m.	15,5		0,0100	0,1136	0,116
14. III. 8³⁰ a. m.	15,5	Hintere Gegend des Vorderarmes	0,0140	0,1590	
16. 8³⁰ a. m.	16		0,0155	0,1761	0,167
5. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Mittlere Gegend der Brust	0,0233	0,2641	
6. 8 a. m.	14,5		0,0222	0,2520	
7. 8 a. m.	15		0,0224	0,2428	0,251
1. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Mittlere Gegend des Bauches	0,0091	0,1041	
2. 8³⁰ a. m.	14,5		0,0080	0,0899	
3. 8 a. m.	15		0,0110	0,1232	0,106
7. III. 8³⁰ a. m.	15	Gegend des Rückens	0,0211	0,2413	
9. 8³⁰ a. m.	15		0,0180	0,2045	0,229
6. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Gegend der Glutaei	0,0123	0,1408	
6. 9 a. m.	14,5		0,0185	0,2080	
11. 8³⁰ a. m.	15,5		0,0142	0,1625	
12. 8³⁰ a. m.	15,5		0,0134	0,1523	0,165
3. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Innere Gegend des Schenkels	0,0072	0,0821	
4. 8³⁰ a. m.	14		0,0098	0,1112	
10. 8³⁰ a. m.	15		0,0093	0,1058	
10. 9 a. m.	15		0,0116	0,1319	0,107
3. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Äußere Gegend des Schenkels	0,0128	0,1451	
4. 8³⁰ a. m.	14		0,0120	0,1360	
9. 8³⁰ a. m.	15		0,0127	0,1450	0,141
1. III. 8³⁰ a. m.	14,5	Regio poplitaea	0,0129	0,1460	
2. 8³⁰ a. m.	14,5		0,0089	0,1010	0,123

Wir suchten auch zu konstatieren, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Menge der Schweißdrüsen und der Größe

der insensiblen Perspiration. In dieser Hinsicht fanden wir nur die folgenden Angaben von Krause im Handbuch von Poirier und Carpy. Nach diesem Autor finden sich in einem Quadratzoll Haut die folgenden Mengen von Schweißdrüsen:

Fläche der Hände	2700
Fläche der Füße	2700
Handrücken	1500
Stirn und Hals	1300
Thorax, Abdomen und Arm	1100
Fußrücken	900
Backe und Schenkel . . .	500—600
Nacken, Rücken, Becken .	400—600

Vergleicht man die oben angegebenen Mittel mit diesen Angaben, so sieht man, daß für gewisse Hautgegenden eine gewisse Übereinstimmung zwischen Größe der Perspiration und Zahl der Schweißdrüsen besteht. So z. B.:

	Perspiration	Zahl der Schweißdrüsen
Fläche der Hände . .	0,601	2700
Handrücken	0,303	1500
Hals	0,432	1300
Thorax	0,251	1100
Schenkel	0,141	500

Man kann jedoch nicht sagen, daß ein konstanter Parallelismus zwischen diesen beiden Daten vorhanden ist, und deshalb kann die Hypothese, daß das aus der Epidermis verdunstende Wasser ganz aus den Schweißdrüsen herstamme, nicht auf ausschließliche Weise angenommen werden; es ist wahrscheinlich, daß auch durch die Hornschichten der Haut eine gewisse Menge Wasserdampf hindurchgeht.

II. Die Perspiratio insensibilis bei verschiedenen gesunden Personen.

Bei dieser zweiten Gruppe von Versuchen maßen wir die Perspiratio insensibilis an verschiedenen Personen bei verschiedenen Umgebungstemperaturen, stets in der vorderen Gegenden des Vorderarmes. Die gefundenen Werte sind auf der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle II.

Datum	Temperatur d. Umgebung °C	Versuchspersonen	Im Apparat in 15 Minuten gesammelte Wassermenge g	Von einem Quadratdezimeter Haut in 1 Stunde perspirierte Wassermenge g	Mittel
13. III. 8 30 a. m.	15,5	Galeotti	0,0110	0,1149	
15. 8 30 a. m.	16		0,0106	0,1205	
19. 8 a. m.	15,5		0,0100	0,1136	0,116
21. III. 5 p. m.	21,5	do.	0,0156	0,1760	
24. 6 p. m.	21		0,0138	0,1598	
30. 6 p. m.	23		0,0144	0,1625	
31. 6 p. m.	23		0,0156	0,1760	0,168
31. V. 9 30 a. m.	22	Azzi.	0,0112	0,1260	
2. VI. 9 45 a. m.	22		0,0122	0,1372	
3. 8 50 a. m.	22		0,0102	0,1148	
4. 8 a. m.	22		0,0125	0,1408	
5. 10 15 a. m.	22		0,0100	0,1224	
6. 10 a. m.	22		0,0089	0,1000	
7. 9 a. m.	22		0,0083	0,0948	
8. 9 a. m.	22		0,0080	0,0912	0,115
5. VI. 9 20 a. m.	22	Lanzilotta	0,0114	0,1576	
6. 9 a. m.	22		0,0084	0,0944	
9. 10 a. m.	22		0,0085	0,0956	
10. 10 a. m.	21		0,0082	0,0920	
11. 10 30 a. m.	21		0,0088	0,0976	0,107
15. IV. 8 30 a. m.	18	Macri	0,0098	0,1100	
16. 8 a. m.	18		0,0096	0,1096	
17. 8 a. m.	17		0,0076	0,0848	0,101
25. V. 9 30 a. m.	21	do.	0,0130	0,1460	
4. VI. 9 a. m.	22		0,0125	0,1404	
5. 10 30 a. m.	22		0,0100	0,1124	
7. 9 30 a. m.	22		0,0080	0,0916	0,123
8. VI. 9 30 a. m.	21	Porcelli	0,0120	0,1348	
9. 9 a. m.	22		0,0100	0,1144	
10. 9 30 a. m.	21		0,0090	0,1111	
12. 11 a. m.	23		0,0080	0,0899	0,116

Aus den oben angegebenen Mitteln ergibt sich klar, daß die Wassermenge, die aus derselben Hautgegend (vordere Gegend des Vorderarmes) bei verschiedenen Personen verdunstet, zwischen nicht sehr weiten Grenzen schwankt, und bei der Durchschnittstemperatur von ca. 20° als um die Zahl von **0,12 g** pro Quadratdezimeter Haut herum pro Stunde schwankend betrachtet werden kann.

Der Einfluß der Umgebungstemperatur ist offenbar, wie aus den an Galeotti und Macri gemachten Bestimmungen hervorgeht. Bei ersterem ergab sich bei der Temperatur von

ca. 15° ein Mittel von 0,116 und bei der Temperatur von ca. 22° ein Mittel von 0,168, d. h. eine Zunahme um 45% pro 7° Temperatur der Umgebung. Beim letzteren ergab sich bei der Temperatur von 17° ein Mittel von 0,101 und bei der Temperatur von 21° ein Mittel von 0,122, d. h. eine Zunahme um 22% pro 4° Temperatur der Umgebung.

III. Die Perspiratio insensibilis bei Fieberkranken.

In der Literatur sind die direkten Untersuchungen über dieses Thema spärlich an Zahl, im Vergleich mit den sehr zahlreichen über die Schweißabsonderung.

Der Erscheinung des Schwitzens wird sogar eine fundamentale Bedeutung beigemessen, namentlich in betreff der Prognose, da es ja bekannt ist, daß bei vielen Krankheiten, wie Lungenentzündung, Malaria, Scharlach, bei den septischen Infektionen, die Apyrexie mit einer intensiven Schweißabsonderung zusammenfällt. Nach Schwenkenbecher und Inagaki besteht ein enger Parallelismus zwischen der Abnahme der Temperatur und der Erzeugung des Schweißes, sicher ist, daß mit der Absonderung des reichlichen Schweißes das Gleichgewicht der Wärmeregulierung wiederhergestellt wird. Jedoch nicht nur in der Periode der Defervescenz, sondern auch während der Akme ist in der Regel die Ausscheidung des Wassers durch die Haut gesteigert; bisweilen ist die Absonderung des Schweißes offenbar und die Haut ist feucht, zu anderen Malen dagegen ist die Verdunstung des Schweißes so rasch, daß die Haut trocken erscheint.

Nach den beiden oben zitierten Autoren werden bei einer Achseltemperatur von 37 bis zu 39° durch die Haut im Durchschnitt 45 g Wasser pro Stunde und pro 100 kg Körpergewicht ausgeschieden; während das normale Mittel 30 g beträgt, werden bei Achseltemperaturen von 39 und 40° 54 g ausgeschieden. Während der Periode des Schüttelfrostes ist die Ausscheidung des Wassers geringer und übersteigt nicht 35 g. Bei kachektischen Fiebern, die lange andauern, nimmt im allgemeinen die Absonderung des Schweißes ab, bei hektischen Fiebern zeigen sich bekanntlich Anfälle von Schwitzen.

Seit langer Zeit ist bekannt, daß bei an Lungenkrankheiten leidenden Individuen die Ausscheidung des Wassers und des Kohlensäureanhydrids durch die Haut gesteigert ist; diese Tat-

sache führte sogar zu der wahrlich kaum anzunehmenden Hypothese, daß die Hautfunktion einigermaßen die veränderte Lungenfunktion ersetzen könne (Röhrig, Ziemßen, Peiper).

Unsere Versuche wurden an sechs Kranken angestellt, die sich in verschiedenen Krankheitsstadien befanden, und bei verschiedenen Temperaturen. Die Bestimmungen wurden stets in derselben Weise vorgenommen, immer in der vorderen Gegend des Vorderarmes. Wir trugen Sorge dafür, daß wir Momente wählten, in denen der Kranke sich nicht in der Verfassung sichtbaren Schwitzens befand, weshalb unsere Zahlen sich stets auf die Perspiration beziehen. Wir notierten stets die Temperatur der Umgebung und die Körpertemperatur, die in der Achselhöhle gemessen wurde, da die Temperatur des Rectums nicht gemessen werden konnte.

Tabelle III.

Datum	Temperatur d. Umgebung °C	Versuchsperson	Krankheit	Körpertemperatur °C	Im Apparat in 15 Minuten gesammelte Wassermenge g	Von einem Quadratdezimeter Haut in 1 Stunde perspirierte Wassermenge g
28. IV. 2 p. m.	20	A. Vallifusco	Lungentuberkulose	38,3	0,0370	0,4190
29. 10 a. m.	20			38,7	0,0222	0,2519
2. V. 6 p. m.	21			38,9	0,0224	0,2526
4. 9. a. m.	18			38,2	0,0140	0,1573
29. IV. 10 a. m.	20	J. Joffredi	do.	39,2	0,0154	0,1754
7. V. 11 a. m.	20			38,7	0,0122	0,1390
7. 6 p. m.	21			38,9	0,0172	0,1934
13. 6 p. m.	20			36,6	0,0166	9,1866
30. IV. 12	24	D. Polselli	do.	39,3	0,0200	0,2280
2. V. 6 p. m.	21			38,6	0,0198	0,2254
4. 9 a. m.	18			38,3	0,0090	0,1025
6. 11 a. m.	19			38,2	0,0160	0,1824
6. V. 11 a. m.	19	G. Masserelli	do.	36,3	0,0194	0,2180
7. 11 a. m.	20			36,7	0,0130	0,1461
7. 6 p. m.	21			38,0	0,0138	0,1640
9. 4 p. m.	24			36,9	0,0144	0,1660
13. 6 p. m.	20			37,9	0,0146	0,1662
15. V. 11 a. m.	20	L. Cutarello	Leukämie	38,6	0,0136	0,1550
15. 5 p. m.	20			38,8	0,0166	0,1866
16. 11 a. m.	20			37,4	0,0086	0,1307
16. 5 p. m.	20			38,1	0,0154	0,1730
26. V. 5 p. m.	21	E. Liberato	Pyelonephritis	38,5	0,0126	0,1418
27. 11 a. m.	22			37,4	0,0088	0,1279
27. 5 p. m.	23			39,5	0,0130	0,1462
30. 9 a. m.	22			37,6	0,0118	0,1327

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß bei Fieberkranken die Hautverdunstung stets im Vergleich mit den bei gesunden Individuen erhaltenen normalen Mitteln gesteigert ist, und diese Steigerung ist bisweilen beträchtlich. Während nämlich, wie wir sahen, das Mittel des durch die Haut verdunsteten Wassers ungefähr 0,12 g pro Quadratzentimeter und Stunde ist, erhält man bei Fieberkranken Zahlen, die oft höher als 0,20 g sind.

Ferner ist zu bemerken, daß, während bei normalen Individuen die Schwankungen der Hautverdunstung von Tag zu Tag, bei gleichen Umgebungstemperaturen, sehr leicht sind, bei Fieberkranken dagegen große Sprünge eintreten, die im allgemeinen der Körpertemperatur nicht entsprechen.

Es läßt sich vernunftgemäß annehmen, daß diese Sprünge der Perspiratio insensibilis mehr als von anderen Ursachen von den Kreislaufbedingungen der Haut abhängen, welche Bedingungen bei Fieberkranken sehr instabil und tiefgehenden, raschen Modifikationen unterworfen sind.

Zusammenfassung.

1. Die Perspiratio insensibilis variiert in den verschiedenen Körpergegenden eines und desselben Individuums. Am größten ist sie in den Handflächen, etwas geringer auf Hals und Wangen, noch geringer auf Brust und Rücken. In den anderen von uns betrachteten Gegenden hat sie ungefähr übereinstimmende Werte, die um 0,12 g Wasser pro Quadratdezimeter Haut und Stunde herum schwanken.

2. Bei einigen Körperteilen herrscht eine gewisse Übereinstimmung zwischen Zahl der Schweißdrüsen und Größe der Hautverdunstung. Diese Übereinstimmung besteht jedoch nicht für die ganze Hautfläche, so daß die Hypothese, daß das aus der Epidermis verdunstende Wasser ganz von den Schweißdrüsen herstamme, nicht in ausschließlicher Weise angenommen werden kann, und es ist wahrscheinlich, daß auch durch die Hautschichten der Epidermis eine gewisse Menge Wasserdampf hindurchgeht.

3. Die Wassermenge, die aus derselben Hautgegend (vordere Gegend des Vorderarmes) bei verschiedenen Personen verdunstet, schwankt zwischen engen Grenzen und es läßt sich annehmen, daß sie bei der Durchnittstemperatur von ca. 20° um

die Zahl von 0,12 g pro Quadratdezimeter Haut pro Stunde herum beträgt.

4. Die Temperatur der Umgebung übt einen nicht gering anzuschlagenden Einfluß auf die Hautverdunstung in dem Sinne aus, daß mit der Zunahme der Temperatur auch die Perspiratio insensibilis zunimmt.

5. Bei Fieberkranken ist die Hautverdunstung stets gesteigert im Vergleich mit den bei gesunden Individuen erhaltenen normalen Mitteln, und diese Steigerung ist bisweilen eine beträchtliche. Während nämlich, wie wir gesehen haben, das Mittel des aus der Haut verdunsteten Wassers ca. 0,12 g pro Quadratdezimeter und Stunde ist, zeigen sich bei Fieberkranken Zahlen, die häufig größer als 0,20 sind.

Ferner ist zu bemerken, daß, während bei normalen Individuen die Schwankungen der Hautverdunstung von Tag zu Tag, bei gleichen Umgebungstemperaturen, sehr leicht sind, bei Fieberkranken hingegen große Sprünge eintreten, die im allgemeinen der Körpertemperatur nicht entsprechen.

Es läßt sich vernunftgemäß annehmen, daß diese Sprünge der Perspiratio insensibilis mehr als von anderen Ursachen von den Kreislaufbedingungen der Haut abhängen, welche Bedingungen bei Fieberkranken sehr instabil und tiefgehenden, raschen Modifikationen unterworfen sind.

Literatur.

Röhrig, Physiologie der Haut, 1876.

Schierbeck, Arch. f. Hygiene 16, 203, 1893; Arch f. Anat. u. Physiol. Phys. Abt. 1893, 116.

Nuttall, Arch. f. Hygiene 23, 184, 1895.

Willebrand, Skand. Arch. 13, 337, 1902.

Osborne, Journ. of Physiol. 41, 345, 1910.

Kalman, Arch. f. d. ges. Physiol. 112, 561, 1906.

Galeotti und Signorelli, diese Zeitschr. 41, 268, 1912.

Schwenkenbecher und Inagaki, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1905, 4, 383.

Schwenkenbecher, Die pathologischen Störungen der Hautsekretion, in Krehls Handb. d. allg. Pathol. Leipzig 1913.

Über die Autolyse normaler und nephritischer Nieren.

Von

Friedrich Simon (Berlin).

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 1. August 1914.)

In den 24 Jahren, die verflossen sind, seitdem E. Salkowski die „Autodigestion der Organe“ aufgefunden hat, hat sich das Interesse der Forscher für die intracellulären Fermentwirkungen unvermindert rege erhalten. Gleichwohl liegen nur ziemlich spärliche Beobachtungen über autolytische Vorgänge in pathologisch veränderten Organen bzw. Geweben vor:

In erster Reihe bei Phosphorvergiftung und Carcinom, dann aber auch bei Pneumonie, akuter gelber Leberatrophie, HCN- und HCl-Vergiftung und — aus jüngster Zeit — bei experimenteller Pneumokokkeninfektion der Kaninchen[1]) sowie an Lebern sensibilisierter Meerschweinchen[2]). Trotz aller ätiologischen Verschiedenheiten und aller Besonderheiten der anatomischen Substrate sind die genannten Befunde insofern bemerkenswert, als sie den Wirkungsbereich und die Bedeutung aufzeigen, die den autolytischen Organfermenten nicht nur innerhalb der Breite physiologischen Geschehens, sondern auch beim krankhaften Ablauf wichtiger Lebensvorgänge zukommt. So leicht begreiflich das Vorkommen einer „pathologischen“ Autolyse (d. h. intracellulärer, unter pathologischen Bedingungen veränderter Fermentwirkungen) an sich erscheint, um so größere Schwierigkeiten bereitet das genauere Verständnis und die rationelle Erklärung dieser Veränderungen selbst. Wie läßt sich z. B. der zuerst von Jacoby[3]) erhobene Befund deuten, daß durch Phosphor schwer geschädigte Leberzellen noch zu erhöhten fermentativen Leistungen befähigt sind? Werden hier beim Untergang von Zellen deren endogene Enzyme in Freiheit gesetzt oder werden unter dem Ein-

---

[1]) Medigreceanu, Journ. of Exp. Med. 19, Heft 3, S. 309, 1914.

[2]) Hashimoto und Pick, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 76, 89, 1914.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 174 bis 181, 1900.

flusse toxischer Vitalitätsstörungen gewisse physiologische Hemmungen der Autolyse aufgehoben oder handelt es sich nur um Transport und Aufnahme organfremder proteolytischer Fermente in bereits degenerierte Gewebselemente? Alle diese — aus einem ganz speziellen Problem heraus gestellten — Fragen warten noch auf ihre experimentelle Bearbeitung — ebenso wie die wichtigere, weil weiter reichende: Ob die bei der Phosphorleber abnorm gesteigerte Autodigestion das regelmäßige Verhalten jedes irgendwie erkrankten Organes kennzeichnet oder ob nicht — als unmittelbarere Wirkung intravitaler Zellschädigungen — auch eine Schwächung der autolytischen Aktivität unter geeigneten Versuchsbedingungen zustande kommen könne?

Das Bestehen der zweiten Möglichkeit, das von Glikin und Loewy[1]), sowie von Aronsohn und Blumenthal[2]) durch den Nachweis gehemmter Autolyse an den Muskeln HCN- und HCl vergifteter Hunde bzw. an den Lebern fiebernder Kaninchen festgestellt wurde, bildete die Voraussetzung meiner Untersuchungen. Zu diesen wählte ich die „experimentelle Nephritis" der Kaninchen als Paradigma einer Organläsion, deren Anatomie genau genug erforscht war, um einen Vergleich der autodigestiven Leistungen mit denjenigen normaler Kaninchennieren zu erlauben.

Allerdings ist bei derartigen Vergleichungen stets zu berücksichtigen, daß die experimentellen Nierenaffektionen erstens nicht ohne weiteres mit den spontanen und aus natürlichen Ursachen entstandenen Nephritiden identifiziert werden dürfen und zweitens keine deutliche Abhängigkeit der intra vitam beobachteten Funktionsstörung vom anatomischen Befunde erkennen lassen. Diese mangelnde Übereinstimmung zwischen dem histologischen Bilde der geschädigten Gewebe und ihrer physiologischen Leistungsfähigkeit wurde auch von Schlayer und Hedinger[3]) festgestellt und kommt in ihrer Unterscheidung zweier Typen von akuter toxischer Nephritis zum Ausdruck: 1. Der vasculären, die an den Gefäßen beginnt und — bei auffallend geringen anatomischen Veränderungen — schnell zu völliger Insuffizienz der Gefäße mit Vernichtung der Wasserausscheidung führt; 2. der tubulären, die an den Tubulusepithelien einsetzt und — bei schwerer anatomischer Destruktion — lange Zeit unveränderte oder sogar vermehrte Gefäßtätigkeit und Wasserausscheidung zeigt. Eine so scharfe Abgrenzung zweier Nephritisformen vermag aber Suzuki[4]) auf Grund äußerst sorgfältiger anatomischer Untersuchungen nicht als berechtigt anzuerkennen; nach Suzuki gibt es keine experimentell zu erzeugenden vasculären Nephritiden, sondern nur parenchymatöse mit sehr ungleichartigem Verhalten des Blutdruckes.

---

[1]) Diese Zeitschr. 10, 498, 1908.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. 65, Heft 1, 1908.

[3]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 90, 1, 1907.

[4]) Zur Morphologie der Nierensekretion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Jena 1912.

Die gegensätzlichen Auffassungen von Schlayer und Hedinger einerseits sowie Suzuki andrerseits lassen nun auch bei der Autolyse der durch Gifte angegriffenen Nieren verschiedene Möglichkeiten der Untersuchungsergebnisse zu: Die „vasculären" Affektionen weisen nach Schlayer und Hedinger in der Hauptsache nur zirkulatorische Störungen der betroffenen Nieren und fast gar keine Schädigungen ihres parenchymatösen Zellbestandes auf; man würde also nach Einführung solcher Gifte, die — wie Cantharidin und Arsen — nur „vasculäre" Nephritiden erzeugen, auch keine wesentlichen Schwankungen und insbesondere keine Verminderungen der normalen intracellulären Fermentleistungen erwarten dürfen. Andrerseits behauptet Suzuki, daß es überhaupt keine „vasculäre" Nephritis mit ausschließlich funktioneller Insuffizienz gäbe, sondern daß in jedem Falle von toxischer Nephritis mehr oder minder schwere Beeinträchtigungen der Zellenintegrität nachzuweisen seien; es müßten also alle Giftwirkungen, die überhaupt die Nieren treffen, auch in bestimmten Veränderungen des Zellchemismus — wie z. B. in den Hemmungen der autolytischen Zellfermente — zum Ausdruck kommen. Von dem Ausfall einer solchen Fermentprüfung konnte man sich deshalb gewisse Aufschlüsse zur Pathologie der „tubulären" und „vasculären" Nephritis versprechen, Aufschlüsse, die um so wünschenswerter erschienen, als eine scharfe Differenzierung der beiden Erkrankungsformen auf Grund der vorliegenden anatomischen Befunde noch keineswegs sichergestellt war. Denn bei der Cantharidinnephritis, die — als ausgesprochene „vasculäre" Affektion — eigentlich nur Glomerulus- bzw. Kapselveränderungen hätte aufweisen sollen, wurden diese von Dunin[1]) und von Suzuki[2]) vermißt und andrerseits die tubulären Apparate, entgegen der theoretischen Voraussetzung, durchaus nicht immer intakt befunden, wie aus den Beobachtungen der letztgenannten beiden Autoren und noch mehrerer anderer [Aufrecht[3]), Cornil[4]), Eliaschoff[5]), Hellin und Spiro[6]) hervorgeht. Daß freilich die Chromnephritis eine vorwiegend oder sogar oft ausschließlich tubuläre Lokalisation zeigt, haben viele Untersucher übereinstimmend festgestellt, so u. a.: Baehr[7]), Hedinger[8]), Kabierske[9]), Schlayer und Hedinger (l. c.), Suzuki (l. c.), Takayasu[10]), Weigert[11]). Man durfte also bei der Cantharidinvergiftung nicht minder als bei der durch Chrom mit

[1]) Virchows Archiv 93, 286, 1883.
[2]) l. c.
[3]) Centralbl. f. med. Wiss. 1882, Nr. 47.
[4]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 90, 188 bis 191, 1880.
[5]) Virchows Arch. 94, 323, 1883.
[6]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 38, 375ff., 1897.
[7]) Zieglers Beitr. 55, Heft 3, 1913.
[8]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 100, 1910.
[9]) Inaug.-Diss., Breslau 1880.
[10]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 92, 127, 1908.
[11]) Virchows Arch. 72, 254, 1878.

einiger Wahrscheinlichkeit auf die Ausbildung parenchymatöser Nierenschädigungen und unter Umständen auf die Möglichkeit rechnen, sich über diese Veränderungen nicht nur mittels morphologischer, sondern auch chemischer Untersuchung genauer zu unterrichten, und zwar durch den Nachweis abnorm verlaufender autolytischer Prozesse an dem erkrankten Organ.

Diese Erwägungen führten zum Ausgangspunkt meiner Versuche über „pathologische“ Autolyse und bestimmten mich, die Niere als geeignetes Organ und die Cantharidin- bzw. Chromvergiftung als Mittel zur Erzeugung experimenteller Nephritis zu wählen.

Um aber Abweichungen von dem normalen autolytischen Verhalten überhaupt feststellen zu können, war es zunächst erforderlich, eine Reihe von Vergleichswerten durch Vornahme der Autodigestion an gesunden Nieren zu gewinnen.

Zwar konnte an dem Bestehen einer Nierenautolyse an sich nicht gezweifelt werden, da Hedin und Rowland[1]) bei der Digestion von Nierenpreßsäften (unter Toluolzusatz bei Körpertemperatur) eine Zunahme der durch Gerbsäure nicht fällbaren N-Substanzen gefunden und diese Proteolyse als eine fermentative nachgewiesen hatten; doch die analytischen Daten von Hedin und Rowland konnten als Vergleichswerte für mich nicht in Betracht kommen, da diese Autoren nur Preßsäfte von Organen (statt ihrer selbst) und als Versuchstiere nicht die für meine Zwecke geeigneten Kaninchen, sondern Kälber, Pferde und Hunde verwendet hatten. Auch aus neuester Zeit liegen Beobachtungen von Medigreceanu (l. c.) vor, der zwar mit Kaninchennieren gearbeitet, seine Autolyseversuche jedoch gleichfalls an wässerigen Organauszügen angestellt hatte. Medigreceanu autolysierte Nieren (und auch Lebern) von normalen und solche von mit Pneumokokken infizierten Kaninchen; er konnte aber hinsichtlich der proteolytischen Leistung der Nierenextrakte keine konstanten Unterschiede zwischen kranken und gesunden Tieren feststellen.

Ich habe zunächst (in 3 Versuchen) die Nieren von 7 gesunden Kaninchen autolysiert. Bei dem ersten Versuch wurden die Nieren von 3 soeben durch Genickschlag und Halsschnitt getöteten Kaninchen zu feinem Brei gewiegt und mit dem zehnfachen[2]) Volumen Chloroformwasser zur Autolyse angesetzt. Nach 72 stündiger Digestion bei 38 bis 40° wurde das Gemisch, mit Essigsäure ganz schwach angesäuert, in der Siedehitze auskoaguliert. Im Filtrat wurden dann 1. der Gesamt-N nach

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 531, 1901.

[2]) 32 g Nierenbrei mit 320 g Chloroformwasser.

Kjeldahl und 2. der Gesamt-P in der Weise bestimmt, daß ein aliquoter Teil des Filtrats zur Trockne gedampft, der Rückstand mit Salpetermischung geschmolzen und in der Lösung der Schmelze der P-Gehalt schließlich gewichtsanalytisch als $Mg_2P_2O_7$ ermittelt wurde. Beim zweiten Versuch wurden ebenfalls die Nieren dreier gesunder Kaninchen verwendet. Vom frischen Organbrei wurden 15,1 g als „Hauptversuch" ebenso wie beim ersten Versuch und außerdem 12,6 g als „Kontrollversuch" zur Autolyse angesetzt — letzterer in der Weise, daß das Gemisch vor Beginn der Digestion ganz schwach mit Essigsäure angesäuert und aufgekocht wurde. Digestionsdauer wiederum 72 Stunden und weitere Behandlung wie bei Versuch 1. Ein dritter Versuch wurde dann noch mit den Nieren eines gesunden Kaninchens von 2500 g unternommen und als Haupt- und Kontrollversuch in der eben beschriebenen Weise durchgeführt.

Tabelle I.

Autolyse normaler Kaninchennieren.

Versuch	Herkunft d. Nieren	Aus je 100 g frischer Niere gingen in Lösung an				N : P beim	
		nicht koagulierb. N beim		Gesamt-P beim			
		Hauptversuch	Kontrollversuch	Hauptversuch	Kontrollversuch	Hauptversuch	Kontrollversuch
1	Von 3 gesunden Kaninchen	0,8164	—	0,2162	—	3,77	—
2	Von 3 gesunden Kaninchen	0,8820	0,2284	0,2338	0,0912	3,77	2,50
3	Von einem gesunden Kaninchen (2500 g)	0,9184	0,2536	0,2400	0,1040	3,82	2,44
	Durchschnittswerte für das einzelne Tier .	**0,8722**	**0,2410**	**0,2300**	**0,0976**	**3,78**	**2,47**

Wie aus Tabelle I, Stab 2 ersichtlich, geht während der 72 stündigen Digestion — vermittelst Extraktion allein — eine nicht unbeträchtliche Menge von N-Verbindungen in Lösung, die sich aus Blut- und Harnbestandteilen, anderen Produkten der Nierentätigkeit und zum großen Teil wohl aus Organeiweiß zusammensetzt. Letzteres nach Art und Herkunft näher zu charakterisieren erübrigt sich hier; doch dürften von den aus der Niere isolierten und genauer beschriebenen Eiweißkörpern

weder das von Gottwalt[1]) extrahierte Serumalbumin und Globulin noch die von Halliburton[2]) und Lönnberg[3]) dargestellten „Nucleoalbumine", noch Leo Liebermanns[4]) Nierenlecithalbumin zu den löslichen N-Verbindungen des Kontrollversuchs gehören. Der Wert des nicht koagulierbaren N steigt aber im Hauptversuch um das 3,6fache; seine Zunahme — dem Kontrollversuch gegenüber — beträgt durchschnittlich 0,6312 N auf je 100 g frischer Niere: ein deutlicher Beweis für die lebhafte Aktivität der intracellularen autodigestiven Fermente.

Weniger stark befördern die autolytischen Vorgänge die Lösung des organisch gebundenen Phosphors; wie Salkowski[5]) schon bei seinen ersten Autodigestionsversuchen an Hundelebern festgestellt hat. Der Gehalt meiner Autolysegemische an gelöstem P übertrifft im Hauptversuch den entsprechenden des Kontrollversuchs um das 2,35fache; aus je 100 g frischer Niere werden durch autolytische Fermentwirkung allein durchschnittlich 0,1324 P in die lösliche Form übergeführt. Als Muttersubstanzen des auf diesem Wege in Lösung gebrachten P könnten zunächst die von Lönnberg (l. c.) und Halliburton (l. c.) aus Nieren gewonnenen „Nucleoalbumine" in Betracht kommen, wenn auch eine umfangreichere autodigestive Spaltung dieser Verbindungen kaum anzunehmen ist. Wahrscheinlicher ist die Einwirkung der autolytischen Fermente auf die Nierennucleoproteide unter Abspaltung von Nucleinsäure[6]), deren organisch gebundener Phosphor unter dem Einflusse der Nuclease weiterhin in Phosphorsäure übergeführt werden kann. Ferner hat Salkowski (l. c.) auf die mögliche Bedeutung des Lecithins für die hier in Rede stehenden Vorgänge der autodigestiven P-Abspaltung hingewiesen. Diese Annahme findet eine Stütze

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 437.

[2]) Journ. of Physiol. 13, 806, 1892.

[3]) Refer. Maly 20, 11.

[4]) Arch. f. d. ges. Physiol. 50, 55 und 54, 573.

[5]) Zeitschr. f. klin. Med. 17 (Suppl.), 1890.

[6]) Mandel und Levene (Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 140) haben eine Nucleinsäure aus Rinderniere dargestellt und deren P-Gehalt be stimmt.

in dem analogen Verhalten der Phosphatide, das ich[1]) bei der Autolyse des Gehirns beobachten konnte. Vorher hatten schon Waldvogel[2]) in der Leber und Coriat[3]) im Gehirn lecithinspaltende Enzyme nachgewiesen. Ob nun bei der Autodigestion der Nieren ihr — u. a. von Lusena[4]) und Rubow[5]) bestimmter — Gehalt an eigentlichem Lecithin oder etwa das aus ihnen von Liebermann isolierte Lecithalbumin an der Lieferung des abzuspaltenden P beteiligt ist, ist von geringerer Wichtigkeit und soll hier nicht näher erörtert werden.

Nachdem so eine Reihe von Vergleichswerten normaler Nieren gewonnen worden war, habe ich die Autolyse pathologisch veränderter Organe geprüft.

A. Versuche mit Chrom-Nieren.

Seitdem es Gergens[6]) — wohl als erstem — gelungen war, durch subcutane Injektion von Chromaten bei Kaninchen und Hunden charakteristische Nierenveränderungen mit entsprechenden klinischen Erscheinungen hervorzurufen, haben sich zahlreiche Forscher der Chromvergiftung zur Erzeugung der experimentellen Nephritis bedient, u. a. Baehr[7]), Hedinger[8]), Hellin und Spiro[9]), Kabierske (l. c.), Pander[10]), Posner[11]), Schlayer und Hedinger (l. c.), Suzuki (l. c.), Takayasu (l. c.), S. Weber[12]), Weigert. Die meisten der Autoren haben K_2CrO_4 verwendet, Kabierske außerdem auch $K_2Cr_2O_7$ und $(NH_4)_2CrO_4$, Pander: Chromoxydverbindungen organischer Säuren (insbesondere milchsaures Chromoxydnatrium); die Verabreichung geschah meistens subcutan, in einigen Fällen auch per os (Kabierske) oder intravenös (Pander, Weber)

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 72, 463.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 200.
[3]) Amer. Journ. of Physiol. 12, 353 bis 362.
[4]) Zitiert nach Oppenheimers Handb. d. Biochem. 3, 1, 476, 1910.
[5]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 52, 173, 1905.
[6]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 6, 148, 1877.
[7]) l. c.
[8]) l. c.
[9]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 38, 375, 1897.
[10]) Dissertat. Dorpat 1887.
[11]) Virchows Arch. 79, 334, 1880.
[12]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 54, H. 1 u. 2, 1906.

oder direkt in den Hauptstamm einer Nierenarterie (Baehr); die verabfolgten Einzeldosen schwankten bei subcutaner Injektion von K_2CrO_4 zwischen 0,025 und 0,4 g. Die zu Erzielung deutlicher Giftwirkungen bzw. objektiv feststellbarer Organveränderungen in den einzelnen Versuchen beanspruchte Zeitdauer wechselte naturgemäß nach der Art der Einverleibung und der eingeführten Chrommenge, betrug jedoch in vielen Fällen weniger als 24 Stunden.

Bei meinen — in Tabelle II — wiedergegebenen Versuchen habe ich ausschließlich subcutane Injektionen wässeriger K_2CrO_4-Lösungen angewendet; in der Mehrzahl der Fälle betrug die (meist nur einmal verabreichte) Einzeldosis 0,02 g pro kg Kaninchen — eine zur Hervorrufung deutlicher und für die beabsichtigte Nierenschädigung charakteristischer Krankheitssymptome stets ausreichende Giftmenge. Keins der 8 Tiere ging an seiner Chromintoxikation zugrunde; sie wurden vielmehr sämtlich bei gutem Kräfte- und Ernährungszustand getötet, und zwar nach verschieden langer Beobachtungsdauer: ein Kaninchen nach 48 Stunden, fünf nach 72 Stunden, eins nach 6 und eins nach 7 Tagen. Die Nieren wurden unmittelbar nach der Tötung herausgenommen und nach der gleichen Versuchsanordnung, wie sie für die Verarbeitung der normalen Nieren beschrieben worden ist, autolysiert.

Was nun zunächst die autodigestive Proteolyse dieser Versuchsreihe betrifft, so lassen sich deren Ergebnisse nicht nach einer einheitlichen Formel, etwa nach einem aus allen 8 Versuchen berechneten Durchschnittswerte, wiedergeben. Denn wie aus Tabelle II ersichtlich ist, war bei den nach 2, 6 oder 7 Tagen getöteten Kaninchen (Nr. 1, 7 und 8) die Menge des in Lösung gegangenen N — im Vergleich mit dem Durchschnittswerte der normalen Tiere — nur unerheblich verringert bzw. um ein geringes erhöht. Bei den nach 3 tägigem Bestehen der Nephritis getöteten Kaninchen aber (Nr. 2 bis 6) gingen aus je 100 g frischer Niere durchschnittlich nur 0,6440 g N (Normalwert im Durchschnitt = 0,8722 g) in Lösung; bei diesen letzten 5 Kaninchen war also regelmäßig eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Hemmung der autodigestiven Nierenproteolyse festzustellen — eine Hemmung, die in einem

Tabelle II. Nierenautolyse nach subcutanen Chrominjektionen.

Kaninchen Nr.	Es wurden verabreicht an K_2CrO_4 pro 1 kg	Aus je 100 g frischer Niere gingen in Lösung an nicht koagulierbarem N		Gesamt-P		N : P		Harnbefund kurz vor der Tötung	Gehalt der Niere an Cr_2O_3
		beim Hauptversuch g	beim Kontrollversuch g	beim Hauptversuch g	beim Kontrollversuch g	beim Hauptversuch	beim Kontrollversuch		
1	0,02 g 48 Std. vor der Tötung	0,8006	—	0,1866	—	4,29	—	Albuminurie; granul. Zylinder	0,042 %
2	0,02 g 72 „ „ „ „	0,4758	—	0,1538	—	3,09	—	do.	Nicht bestimmt
3	0,02 g 72 „ „ „ „	0,6890	—	0,1920	—	3,59	—	do.	0,019 %
4	0,02 g 72 „ „ „ „	0,8190	0,3200	0,1724	0,0760	4,75	4,21	Albuminurie; Menge der granul. Zylinder in Abnahme begriffen	Nicht bestimmt
5	0,02 g 72 „ „ „ „	0,8066	0,2982	0,1916	0,0850	4,21	3,50	Albuminurie; zahlr. granul. Zylinder; Leukocyten u. Nierenepithelien in geringer Menge	do.
6	0,02 g 72 „ „ „ „ 0,02 g 24 „ „ „ „	0,4298	—	0,1570	—	2,73	—	Albuminurie	do.
7	0,02 g 6 Tage „ „ „	0,9010	—	0,1850	—	4,87	—	Albuminurie; granul. Zylinder, Leukocyten u. Nierenepithelien in großer Menge	0
8	0,01 g 7 „ „ „ „ 0,02 g 4 „ „ „ „	0,8616	—	0,2082	—	4,14	—	Albuminurie; granul. Zylinder stark in Abnahme begriffen; Leukocyten u. Nierenepithelien jedoch in großer Menge	0,044 %

Falle (Nr. 6) sogar eine Verminderung des löslichen N bis auf die Hälfte (49,3%) des normalen Durchschnittswertes bewirkt hatte. In der Gruppe der Kaninchen mit 3tägiger Nephritis befinden sich allerdings 2 Tiere (Nr. 4 und 5) mit relativ hohen, wenn auch immer noch unter dem normalen Durchschnitt bleibenden N-Zahlen. Wie aus dem Harnbefunde zu entnehmen, war in diesen beiden Fällen die Nierenaffektion zur Zeit der Tötung bereits im Abklingen begriffen bzw. in das Stadium der Regeneration getreten. Ebenso dürfte bei den Kaninchen Nr. 1, 7 und 8 die schwache bzw. gänzlich fehlende Hemmung der Proteolyse durch den Umstand zu erklären sein, daß die die autolytischen Fermente schädigenden Nierenveränderungen noch nicht oder nicht mehr auf ihrer vollen Höhe standen oder auch durch regenerative Vorgänge und die damit verbundene Neubildung leukocytärer und anderer intracellulärer Enzyme paralysiert wurden. Ein Hinweis auf derartige regenerative Einflüsse erscheint in der Tat nicht nur durch Rückschlüsse aus dem Harnbefunde gerechtfertigt, sondern auch durch direkte Beobachtungen begründet, wie sie Kabierski (l. c.) und Suzuki (l. c.) bei 5 bzw. 7 Tage alter Chromnephritis machen konnten.

In geringerem Maße beeinflußt die Gewebsregeneration wie überhaupt der Entwicklungsgrad des nephritischen Prozesses die Intensität der autolytischen Phosphorabspaltung. Denn bei allen Tieren dieser Versuchsreihe — gleichgültig, in welchem Stadium ihrer Nierenaffektion sie getötet wurden — blieb die Menge des in Lösung gegangenen P hinter den entsprechenden Normalwerten zurück; die Durchschnittszahl betrug 0,1808 g P aus je 100 g Chromniere gegenüber 0,2300 g P aus je 100 g gesunder Niere. Bei dem Kaninchen Nr. 1 tritt eine frühzeitig einsetzende, bei den Kaninchen Nr. 4, 5, 7 und 8 eine länger als die Proteolysenhemmung anhaltende Schädigung der P-Abspaltung hervor. Dieses Verhalten offenbart eine größere Empfindlichkeit der Nuclease und kommt zum zahlenmäßigen Ausdruck in der Proportion N : P, die bei den angeführten Fällen den Durchschnittswert der normalen Tiere (3,78) mit den Ziffern 4,29, 4,75, 4,21, 4,87, 4,14 regelmäßig übertrifft. Ähnliche Beobachtungen über eine besonders aus-

gesprochene Empfindlichkeit der Nuclease hat auch Kashiwabara[1]) bei der antiseptischen Autolyse der Thymus machen können. Wenn nämlich als Antisepticum statt des Chloroformwassers eine $^1/_{32}\,^0/_0$ige Formaldehydlösung angewendet wurde, so fand sich im Thymusautolysat überhaupt kein Purinbasen-N, während der Gesamt-N sogar den der entsprechenden Chloroformwasserversuche übertraf. Kashiwabara glaubt aus diesem auffallenden Befunde auf eine allein die Nuclease schädigende, den anderen Proteasen jedoch gleichgültige Wirkung des Formaldehyds schließen zu können. In analoger Weise wird man bei meinen Versuchen annehmen dürfen, daß die nephritische Noxe die phosphorabspaltenden Fermente wenn auch nicht stärker, so doch rascher und anhaltender beeinträchtigt als die eigentlich proteolytischen.

Daß es sich aber bei diesen Hemmungsvorgängen um Eingriffe in die Fermenttätigkeit der Nierenzellen handelt, geht aus den Versuchen Nr. 4 und 5 hervor, bei denen ich außer den Haupt- auch die entsprechenden Kontrollautolysen durchgeführt habe. Diese beiden Kaninchen haben zwar offenbar den Höhepunkt ihrer Nierenerkrankung schon überschritten und weisen keine typischen Befunde gehemmter Autoproteolyse auf; gleichwohl bleiben bei ihnen die Differenzzahlen zwischen Haupt- und Kontrollversuch, durch die eben der fermentative Effekt ausgedrückt wird, hinter den entsprechenden Normalwerten zurück. Für den gelösten N betragen die Differenzwerte 0,4990 bzw. 0,5084 gegenüber 0,6312; für den gelösten P 0,0964 bzw. 0,1066 gegenüber 0,1324. Ohne Zweifel ist also die bei der Chromnephritis beobachtete Hemmung der autodigestiven Proteolyse und Phosphorabspaltung auf eine Schädigung der intracellulären Fermente zu beziehen.

In ätiologischer Beziehung könnte noch der besondere Einwand erhoben worden, daß die festgestellten Störungen der Fermenttätigkeit gar nicht als Äußerungen des nephritischen Prozesses, sondern lediglich als direkte Giftwirkungen des eingeführten Chroms aufzufassen seien. Daß derartige Bedenken nicht allein auf theoretischen Voraussetzungen beruhen, möge

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 85, 169, 1913.

man aus zwei Autolysen entnehmen, bei denen ich die ange nommenen Chromwirkungen zu reproduzieren versucht habe. Nachdem ich zunächst bei einem Kaninchen von 1600 g, das 0,04 g K_2CrO_4 subcutan erhalten hatte und 72 Stunden später — auf voller Höhe seiner Nephritis — getötet worden war, den Chromgehalt der Nieren zu 0,067% Cr_2O_3 [= 0,171% K_2CrO_4 = 0,173% $Cr_2(SO_4)_3$] ermittelt[1]) hatte, wurden die vier Nieren zweier gesunder Kaninchen in zwei Portionen zu je 8,5 g mit Chloroformwasser zur Autolyse angesetzt. Der einen Mischung wurden noch 0,0145 g K_2CrO_4 (entsprechend obigen 0,171%), der anderen noch 0,0147 g $Cr_2(SO_4)_3$ (entsprechend obigen 0,173%) zugefügt. Nach 3 tägiger Digestion bei 38 bis 40° waren in Lösung gegangen: in dem Autolysat mit K_2CrO_4-Zusatz 0,5482 N und 0,1952 P (berechnet auf je 100 g Niere), in dem Autolysat mit $Cr_2(SO_4)_3$-Zusatz 0,6740 N und 0,1658 P. Diese Zahlen bleiben hinter den entsprechenden Normalwerten, zum Teil sogar ganz beträchtlich, zurück. Die bloße Gegenwart von Chrom — sowohl in der Chromiform wie auch als Chromat — ist also imstande, auch unabhängig von nephritischen Einwirkungen die Autolyse zu hemmen. Daß die hier festgestellten Fermentschädigungen auch in der nephritischen Chromniere eintreten können, daß zum mindesten die Bedingungen dieses Vorkommnisses auch in vivo gegeben sind, dafür sprechen mein vorhin erwähnter Chromnachweis in den Nieren eines vorbehandelten Kaninchens wie auch die früheren entsprechenden Befunde von Aug. Mayer[2]), Pander (l. c.) und Viron[3]). In der Wirklichkeit des pathologischen Experiments liegen die Verhältnisse aber oft ganz anders. Dies zeigt ein Blick auf die letzte Spalte der Tabelle II, wo der (von mir nach oben angedeuteter Methode bestimmte) Chromgehalt

---

[1]) Nierenbrei getrocknet und verascht. Die Asche mit Salpetermischung geschmolzen. Lösung der Schmelze vom Eisenoxyd usw. abfiltriert. Aus dem Filtrat die Phosphorsäure durch Eintragen von Zinn und starker Salpetersäure ausgefällt. In das Filtrat mehrere Stunden lang H_2S zur Reduktion der Chromsäure eingeleitet. Schließlich $Cr(OH)_3$ mit NH_3 [und eventuell $(NH_4)_2S$] gefällt, getrocknet, geglüht und als Cr_2O_3 bestimmt. Kontrollanalyse von Nierenbrei mit Zusatz gewogener K_2CrO_4-Menge ergab eine Ausbeute von 99,4% des berechneten Cr_2O_3.

[2]) Strickers Med. Jahrbuch 1877, 139.

[3]) Zitiert nach Pander, Dissertat. Dorpat 1887, 50.

einzelner Kaninchennieren verzeichnet ist. Es ist bemerkenswert, daß unter 4 Fällen nur in einem (Nr. 7) jene antifermentative Chromwirkung — und noch dazu nur in negativem Sinne — zum Ausdruck kommt, daß jedoch sonst Höhe des Chromgehaltes und Stärke der Autolysenhemmung keineswegs parallel gehen. Damit erledigt sich der Einwand, daß die bei der Chromnephritis beobachtete Beeinträchtigung der autodigestiven Proteolyse und Phosphorabspaltung gar nicht mit der Erkrankung des Organs im Zusammenhang stehe, sondern nur mit den antifermentativen Eigenschaften des in der Niere deponierten Chroms. Es ist offenbar nicht gleichgültig, ob es sich um irgendwelche, einem Organbrei künstlich zugesetzte anorganische Chromverbindungen oder um den in vivo angesammelten Cr-Bestand der Zellen handelt, die das Element in komplexer und deshalb physiologisch unwirksamer Bindung enthalten.

B. Versuche mit Cantharidin-Nieren.

Die meisten der Autoren, die sich des Cantharidins zur experimentellen Hervorrufung der akuten Nephritis bedient haben, haben mit Lösungen des Präparates in Essigäther gearbeitet und subcutane Injektionen in Dosen von 0,0015 bis 0,02 g angewendet. Ich habe meinen Kaninchen krystallisiertes Cantharidin (Merck), in wenigen (meist 2) ccm Aether acetic. gelöst, subcutan eingespritzt, und zwar zwei Kaninchen je 0,01 g und drei weiteren je 0,002 g. Die Dosis von 0,01 erwies sich als so deletär, daß beide Tiere bereits 5 bzw. $5^1/_2$ Stunden später zugrunde gingen. Von den drei Kaninchen, die je 0,002 erhalten hatten, wurde eins nach 4 Stunden — bei anscheinend schlechtem Befinden — getötet, während die anderen beiden 8 Stunden nach der Injektion noch ganz munter waren, jedoch am nächsten Morgen (22 Stunden nach der Einspritzung) tot vorgefunden wurden. Der Zeitpunkt des Todes darf also bei den zwei letztgenannten Tieren (Nr. 4 und 5 der Tabelle III) frühestens in der neunten Stunde ihrer Erkrankung, wahrscheinlich sogar in einer noch späteren, angenommen werden. In diesen beiden Fällen muß man, da die Organe erst mehrere Stunden nach dem Eintritt des Todes herausgenommen und zur

Autolyse angesetzt wurden, mit einer protrahierten, und zwar um das Verweilen in der Leiche verlängerten Autodigestionsdauer rechnen — ein Umstand, der übrigens in den relativ hohen N-Zahlen dieser Kaninchen zum Ausdruck kommt und zur Erklärung der hier etwas auffallenden (aber immer noch subnormalen) Proteolysenwerte ausreichen dürfte. Bei allen Tieren dieser Versuchsreihe ist die äußerst rasch einsetzende Giftwirkung des Cantharidins ausgeprägt, die auch sonst von den Forschern des Gebietes beobachtet wurde. Konnte doch Cornil[1]) den Tod des Kaninchens unter nephritischen Erscheinungen schon nach 20 Minuten durch subcutane Einführung von 0,01 g Cantharidin herbeiführen und Eliaschoff[2]) bereits $^1/_2$ Stunde nach Verabreichung der gleichen Dosis deutliche Glomerulusveränderungen objektiv feststellen. Auch die Angaben anderer Autoren [wie Dunin, Hedinger, Schlayer und Hedinger (l. c.)] über die Fristen bis zum Eintritt des Cantharidintodes bzw. bis zur Ausbildung anatomischer Veränderungen beziehen sich zum Teil nur auf wenige Stunden.

Tabelle III.

Nierenautolyse nach subcutanen Cantharidininjektionen.

Kaninchen Nr.	Kaninchen Gewicht g	Cantharidindosis g	Aus je 100 g Niere gingen in Lösung an: nicht koag. N	Ges.-P	N : P	Harnbefund	Tod des Tieres erfolgt
1	1920	0,010	0,5792	0,1600	3,62	Anurie	Spontan 5 Std. nach der Injektion
2	1900	0,010	0,5406	0,1488	3,63	Anurie	Spontan $5^1/_2$ Std. nach der Injektion
3	1860	0,002	0,5504	0,1716	3,20	Beim Tode in der Blase wenige Kubikzentimeter Harn mit stark Eiweißgehalt; im Sed. Leukocyten u. Blasenepithelien	Durch Tötung. 4 Std. nach der Injektion
4	1950	0,002	0,6412	0,1622	3,95	Albumen ++	Spontan frühestens 8 bis 9 Std. nach der Injektion
5	2000	0,002	0,6242	0,1714	3,64	Anurie	Spontan frühestens 8 bis 9 Std. nach der Injektion
Durchschnittswerte für das einzelne Tier			0,5871	0,1628	3,61		

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **90**, 188 bis 191, 1880.

[2]) Virchows Arch. **94**, 323, 1883.

Was den Ausfall der Autolysenversuche betrifft, so ergibt sich aus Tabelle III, daß bei 72stündiger Autodigestion der Cantharidinnieren die Werte für den in Lösung gegangenen nicht koagulierbaren N und P hinter den entsprechenden Durchschnittszahlen der normalen Nieren regelmäßig zurückbleiben, und zwar weiter zurück als die bezüglichen Werte der Kaninchen mit dreitägiger Chromnephritis. Eine Hemmung der autodigestiven Proteolyse und Phosphorabspaltung kann also mit dem gleichen oder noch größeren Recht auch bei der Cantharidinnephritis angenommen werden. Das Verhältnis N:P beträgt bei den Tieren dieser Versuchsreihe (mit Ausnahme des Kaninchens Nr. 4) etwas weniger als bei den gesunden Kaninchen. Von einer besonderen Empfindlichkeit und einer damit zusammenhängenden relativ stärkeren Schädigung der Nuclease kann also bei der Cantharidinnephritis nicht die Rede sein. Eine so feine Differenzierung und zeitliche Abstufung der antifermentativen Einflüsse war aber auch bei der heftigen Giftwirkung des Cantharidins und dem stürmischen Verlauf der konsekutiven Nierenerkrankung nicht zu erwarten — im Gegensatz zu dem schon beschriebenen Verhalten einiger Kaninchen, deren Nephritis durch das viel weniger akut wirkende Chrom erzeugt worden war.

Tabelle IV.
Vergleichende Zusammenstellung der Nierenautolyse bei normalen und nephritischen Organen.

Herkunft der Nieren	Aus je 100 g Niere gingen durchschnittlich in Lösung an		N:P im Durchschnitt	Es verhält sich die autodigestive	
	nicht koag. N	Gesamt-P		Proteolyse	P-Abspaltung
Von 7 gesunden Kaninchen	0,8722	0,2300	3,78	wie 100	wie 100
Von 5 Kaninchen mit 3tägiger Chromnephritis	0,6440	0,1733	3,71	wie 73,8	wie 75,3
Von 5 Kaninchen mit Cantharidinnephritis .	0,5871	0,1628	3,61	wie 67,3	wie 70,7

Die (in Tabelle IV wiedergegebene) vergleichende Zusammenstellung meiner Autolysenresultate beantwortet zunächst die eingangs aufgeworfene Frage: Ob die — z. B. bei der Phosphor-

33*

eber, beim Carcinom, bei der pneumonischen Lunge — gesteigerte Autodigestion das regelmäßige Verhalten aller pathologisch veränderten Organe darstelle oder ob nicht auch unter geeigneten Versuchsbedingungen eine Schwächung der autolytischen Aktivität zustande kommen könne? Der Ausfall meiner Autolysenversuche bestätigt unzweifelhaft die zweite Möglichkeit. Dieses Ereignis ist nun, soweit es sich wenigstens auf die Chromniere bezieht, keineswegs überraschend und entspricht durchaus unseren bisherigen Erfahrungen über die pathologische Anatomie der Chromnephritis. Als deren charakteristischen Befund bezeichnen zahlreiche Autoren [Baehr (l. c.), Hedinger (l. c.), Hellin und Spiro (l. c.), Kabierske (l. c.), Posner,[1]) Schlayer und Hedinger (l. c.), Suzuki (l. c.), S. Weber,[2]) Weigert (l. c.)] übereinstimmend eine mehr oder minder ausgedehnte Nekrose der Harnkanälchen, besonders der Epithelien in den Tubulis contortis; auch destruktive Kernveränderungen dieser Gewebselemente werden von einzelnen Beobachtern ausdrücklich erwähnt. Es mangelt also nicht an einem objektiv nachweisbaren, zur Erklärung der fermentativen Ausfälle und insbesondere der autolytischen Hemmungen vollkommen ausreichenden anatomischen Substrat. Denn ganz ungezwungen erscheint mir die Auffassung, mit dem Untergang der Nierenepithelien und ihrer Kerne eine gleichzeitige Schädigung der intracellulären Fermente anzunehmen. Das Moment des nur zeitlichen und örtlichen Zusammentreffens der beiden destruktiven Vorgänge ist hierbei zu betonen, nicht aber ihre gegenseitige Abhängigkeit voneinander. Die engen Beziehungen, die bei der Chromnephritis zwischen der gestörten Integrität des Zellenbestandes und der beeinträchtigten Fermentleistung offenbar bestehen, brauchen keineswegs reziproker ursächlicher Art zu sein. Fehlt es doch nicht an Beispielen, die gerade für die gegenteilige Auffassung sprechen: Für eine weitgehende Unabhängigkeit der Fermente vom Leben ihrer Mutterzellen, durch deren Tod oft erst die enzymatischen Kräfte von physiologischen Hemmungen entbunden und in Freiheit gesetzt werden. Dieser Annahme zufolge wäre also die Schädigung der autolytischen Fermente

[1]) Virchows Archiv 79, 334, 1880.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 54, Heft 1 u. 2, 1906.

nicht durch eine Zerstörung der sie produzierenden Nierenzellen zu erklären, sondern beide — vielleicht koordinierten — Vorgänge möglicherweise auf eine gemeinsame Ursache zurückzuführen: Den auf die benachbarten oder sogar gleichen Angriffspunkte gerichteten entzündlichen Reiz. Mehr zugunsten des ersten Erklärungsversuches im Sinne einer wechselseitigen Bedingtheit spräche freilich die von mir in einzelnen Fällen von Chromnephritis gemachte Beobachtung, daß mit der wiedereinsetzenden Regeneration des Nierengewebes sich auch die autolytische Tätigkeit zu heben beginnt, wenn anders man nicht gerade diesen Wiedergewinn an fermentativer Kraft den proteolytischen Eigenschaften eingewanderter Leukocyten zuschreiben will.

Gewisse Schwierigkeiten der ätiologischen Deutung scheint auch die Cantharidinnephritis mit ihren noch stärker verminderten Fermentleistungen zu bereiten, wenn man sich wenigstens die von Schlayer und Hedinger (l. c.) vertretene Anschauung zu eigen macht, daß das Cantharidin in der Hauptsache „vasculäre" Störungen mit fast ausschließlicher Beteiligung der Glomeruli und mit auffallend geringem Kanälchenbefund hervorruft. Nach dieser Theorie, welche die auf eine Schädigung der sekretorischen Nierenfunktion gerichtete Cantharidinwirkung in den Vordergrund stellt, ist allerdings die von mir festgestellte Herabsetzung der autodigestiven Proteolyse und P-Abspaltung (um fast $^1/_3$ des normalen Wertes) schwer verständlich, wenn auch die dem „vasculären" Typus eigentümliche und auch von mir regelmäßig beobachtete Hyperämie der Cantharidinniere den Ausfall der Autodigestion leicht im Sinne proteolytischer Hemmung beeinflussen könnte. Zu dieser Annahme berechtigen uns nämlich gewisse Versuchsergebnisse von Preti[1]), der — wenigstens bei der Leberautolyse — den Blutgehalt des Organs nicht gerade als förderndes Moment erkannte, ferner die Beobachtungen von Baer und Loeb[2]) über die autolysehemmenden Eigenschaften des normalen Hundeserums sowie die gleichartigen Feststellungen, die neuerdings Guggenheimer[3]) mit Bezug auf die Sera mancher Nephritiker ge-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 494, 1907.
[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 53, 1, 1905.
[3]) Arch. f. klin. Med. 112, Heft 3/4, 1913.

troffen hat. Doch wenn selbst diese Nebenwirkung der Nierenhyperämie das Zustandekommen autodigestiver Hemmungen wirklich begünstigen sollte, so ist sie doch sicher nicht deren wesentliche oder gar ausschließliche Ursache. Denn, wie u. a. Aufrecht (l. c.), Cornil (l. c.) Dunin[1]), Eliaschoff (l. c.), Hellin und Spiro (l. c.), Suzuki (l. c.) gezeigt haben, erzeugt das Cantharidin keine einfache Glomerulonephritis von vorwiegend vasculär-funktionellem Charakter, sondern auch deutlich ausgeprägte anatomische Veränderungen der Harnkanälchen und ihres Epithelbestandes. Es handelt sich dabei um destruktiv-entzündliche Vorgänge, die sich als einfache epitheliale Desquamation, als Schwellung, Trübung, Granulierung, Vakuolisierung der tubulären Elemente, aber auch als Umwandlung der Epithelien in hyaline Massen, als „Coagulationsnekrose" und körniger Zerfall der Harnkanälchenzellen darstellen können. Die Cantharidinnephritis weist unter Umständen also anatomische Befunde auf, wie sie bei der Chromnephritis in der Regel vorkommen und hier zweifellos eine gewisse Rolle bei der Entstehung der Autolysenhemmungen spielen. Die Annahme liegt nahe, den gleichen pathologischen Veränderungen, wenn sie sich bei der Cantharidinnephritis finden, auch die entsprechende ätiologische Bedeutung beizulegen.

Zusammenfassung.

Bei der antiseptischen Autolyse (72 Stunden bei 38 bis 40°) normaler Kaninchennieren zeigt sich eine Zunahme des nicht koagulierbaren N und des löslichen P um das 3,6- bzw. 2,35fache der entsprechenden Kontrollwerte (d. h. des aus zuvor gekochtem Nierenbrei gelösten N und P); aus je 100 g frischer normaler Niere gehen durchschnittlich 0,8722 N und 0,2300 P in Lösung.

Bei nephritischen Nieren ist die autodigestive Proteolyse und Phosphorabspaltung deutlich gehemmt. Bei dreitägiger Chromnephritis beträgt die Menge des in Lösung gegangenen N bzw. P nur 73,8% bzw. 75,3% der durchschnittlichen Normalwerte; bei Cantharidinnephritis nur 67,3% bzw. 70,7% des bei der Autolyse normaler Nieren in Lösung

---

[1]) Virchows Archiv 93, 286, 1883.

gebrachten N bzw. P. Die beobachtete Hemmung der Autolyse ist auf eine Schädigung der intracellulären Fermente zurückzuführen.

Bei der Chromnephritis waren folgende Besonderheiten des autolytischen Verhaltens festzustellen: 1. Bei einzelnen Kaninchen mit noch nicht oder nicht mehr auf voller Höhe stehender Nephritis war die Hemmung der autodigestiven Proteolyse wenig oder gar nicht ausgeprägt. 2. Es trat eine größere Empfindlichkeit der Nuclease hervor, da die phosphorabspaltenden Fermente rascher und anhaltender geschädigt wurden als die eigentlich proteolytischen.

Erwiderung auf W. Straubs Bemerkungen zur Arbeit: „Beeinflussung der Morphinwirkung durch die Nebenalkaloide des Opiums“.

(Diese Zeitschr. 57, 156, 1913.)

Von

R. Meissner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 10. September 1914.)

Zu Einzelheiten meiner genannten Arbeit ist von verschiedenen Autoren Stellung genommen worden.

Ich möchte hier nur auf die „Bemerkungen“ Straubs eingehen. Ursprünglich hatte ich die Absicht, auf die Ausführungen Straubs gleichzeitig mit einer Kritik der Einwände von J. Pal und E. Popper (diese Zeitschr. 57, 492) zu antworten; doch haben sich die Versuche am isolierten Darm so gehäuft, daß ich sie zum Gegenstand einer eigenen Mitteilung machen möchte, deren Fertigstellung durch meine Einberufung zum Heere derzeit unmöglich geworden ist.

Straub hält mir im sachlichen Teil seiner Bemerkungen entgegen, daß ich seine Mäuseversuche nicht wiederholt hätte. Ich tat dies aus dem Grunde, weil ich sie in unserer Frage nicht für ausschlaggebend gehalten habe und noch halte. Ich hatte vielmehr nur die Aufgabe, festzustellen, ob das Resultat einer „Potenzierung“ von Morphin durch Narkotin auch auf höhere Spezies übertragen sei und bin eben zu einem völlig ablehnendem Schluß gekommen. Erwähnt aber habe ich diese Versuche S. 396 ebenso wie die vorliegenden Froschversuche von Issekutz und Barth. Auf keinen Fall bedingen fehlende (hier gleichgültige) Mäuseversuche einen Einwand gegen die Richtigkeit meiner Kaninchenversuche. Diese letzteren habe ich nach 3 Varianten beschrieben: I.) Bestimmung von Atemvolumen und Atemfrequenz ohne CO_2-Reizung bei verschiedenen Kaninchen, II.) Bestimmung der Frequenz allein, normal und nach Substanzdarreichung am selben Tier, III.) Bestimmung von Volumen und Frequenz mit und ohne CO_2-Darreichung, normal und nach Substanzdarreichung an verschiedenen Tieren.

Straub will meine Werte aus I und II aus methodischen Gründen nicht gelten lassen und bringt für die längst bekannte Tatsache der

Labilität der Kaninchenatmung ein Beispiel. Damit war ich wohl vertraut und beschreibe S. 397 meiner Arbeit alle einzelnen Kautelen. Erst wenn „volle Beruhigung und Gleichmäßigkeit in bezug auf Atmungstätigkeit eingetreten war, wurde der Versuch begonnen". Auch bringen äußere Reize immer nur Frequenzzunahme, niemals aber Verlangsamung der Atmung, wie die untersuchten Opiumbasen, hervor. Daß die vorsichtig durchgeführte Versuchsanordnung am tracheotomierten Tier ein richtiges Urteil gestattet, geht wohl daraus hervor, daß sich sowohl früher als auch bei neuerlich angestellten Versuchen derselben Art nach Codein keine oder nur ganz geringe Änderung des Atemtypus fand. Bei einzelnen meiner Versuche können gewiß Zufälligkeitsmomente mitspielen, wenn aber bei einem ganzen Zyklus die Resultate immer nach einer Seite gehen, dann ist der zu ziehende Schluß gut begründet, in unserem Falle der Satz, daß alle untersuchten Präparate ihrem Morphingehalt entsprechend das Atemzentrum beeinflussen und daß niemals eine Schonung des Atemzentrums in Erscheinung tritt. Daß meine Versuche am gleichen Tiere zu verschiedenen Zeiten nicht Versuche am identischen Individuum sind, habe ich doch selbst gesagt — ihnen deshalb Beweiskraft abzusprechen ist willkürlich. Sie sind als Ergänzung der Befunde an verschiedenen Tieren sehr wohl brauchbar.

Betreffs der Katzenversuche kann ich mich kurz fassen. Ich habe, vom Wunsche beseelt, den Einwänden Straubs gerecht zu werden, seither neue Versuche angestellt. Ich wählte große (3 bis $3^1/_2$ kg) und frisch eingelieferte Tiere; jedesmal trat trotz entsprechender Narkotingabe die typische Morphinwirkung bis zur Raserei ein. Dasselbe Tier noch einmal unter reiner Morphinwirkung zu untersuchen, war unmöglich, denn sämtliche Tiere gingen nach 24 bis 48 Stunden ein (Morphindosis: 0,05 g). Die Katzenversuche Straubs sind unterdessen noch von O. Loeb (Therap. Monatsh. **1914**, 58) wiederholt worden und zwar ebenfalls mit vollständig negativem Erfolg. Wenn zum Schluß Straub meint, im Narkophin eine Kombination gefunden zu haben, die dasselbe leistet wie Opium oder Pantopon, so muß ich doch darauf hinweisen, daß zuerst dem Opium und Pantopon Ballaststoffe vorgeworfen wurden, um endlich im Narkophin ein Produkt zu haben, das therapeutisch nur entsprechend der vorhandenen Morphinmenge wirkt, wo also die Meconsäure und das Narkotin auch nur Ballaststoffe sind.

Für die Regulierung der Atemtätigkeit durch Pantopon, Narkophin, Laudanon und Opium ist nur der Morphingehalt bestimmend, und in dieser Hinsicht sind weder Opium noch Pantopon als inkonstant zusammengesetzt anzusehen; jedem Arzt ist der durchschnittliche Morphingehalt dieser Präparate bekannt.

Berichtigung zur Arbeit: Die Aminosäuren des durch Schwefelsäure hydrolysierten Pferdefleisches.

(Diese Zeitschr. 64, 438.)

Von

Tullio Gayda.

(Eingegangen am 29. Juli 1914.)

Auf ausgesprochenen Wunsch der Kollegen Buglia und Costantino möchte ich folgendes in der Wiedergabe der Ergebnisse genannter Kollegen berichtigen:

Auf Seite 439 Zeile 9 von unten anstatt „Stickstoff" ist „Aminostickstoff" zu lesen.

Auf Seite 448 Zeile 13 bis 11 von unten ist zu lesen: „der fällbare Stickstoff, mit Einschluß des Stickstoffes des Ammoniaks, der Melanine und anderer basischer Stoffe 55,03 % und der nicht fällbare Stickstoff 44,97 %". Alles was hierauf folgt, bis zum Ende des Satzes, ist zu streichen.

Berichtigung zur Arbeit: Beitrag zur Kenntnis des wirksamen Prinzips der Hypothese.

(Diese Zeitschr. 65, 189.)

Von

M. Guggenheim.

(Eingegangen am 15. Juli 1914.)

Von befreundeter Seite wurde ich darauf aufmerksam gemacht, daß die Inaktivierung des Pilocarpins bei der Umwandlung in Pilocarpinsäure bereits von Marshall (Journ. of Physiol. 31, 149, 1906) beschrieben worden ist. Derselbe Autor konstatierte auch das analoge Verhalten anderer pharmakologisch aktiver Lactone (vgl. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 1908, Supplementsband S. 388). Meine Feststellung betreff des Verhaltens von Pilocarpin gegen Alkali stellt also nur eine Bestätigung der Befunde Marshalls dar.

Berichtigung zur Arbeit: Über Pflanzenenzyme II.

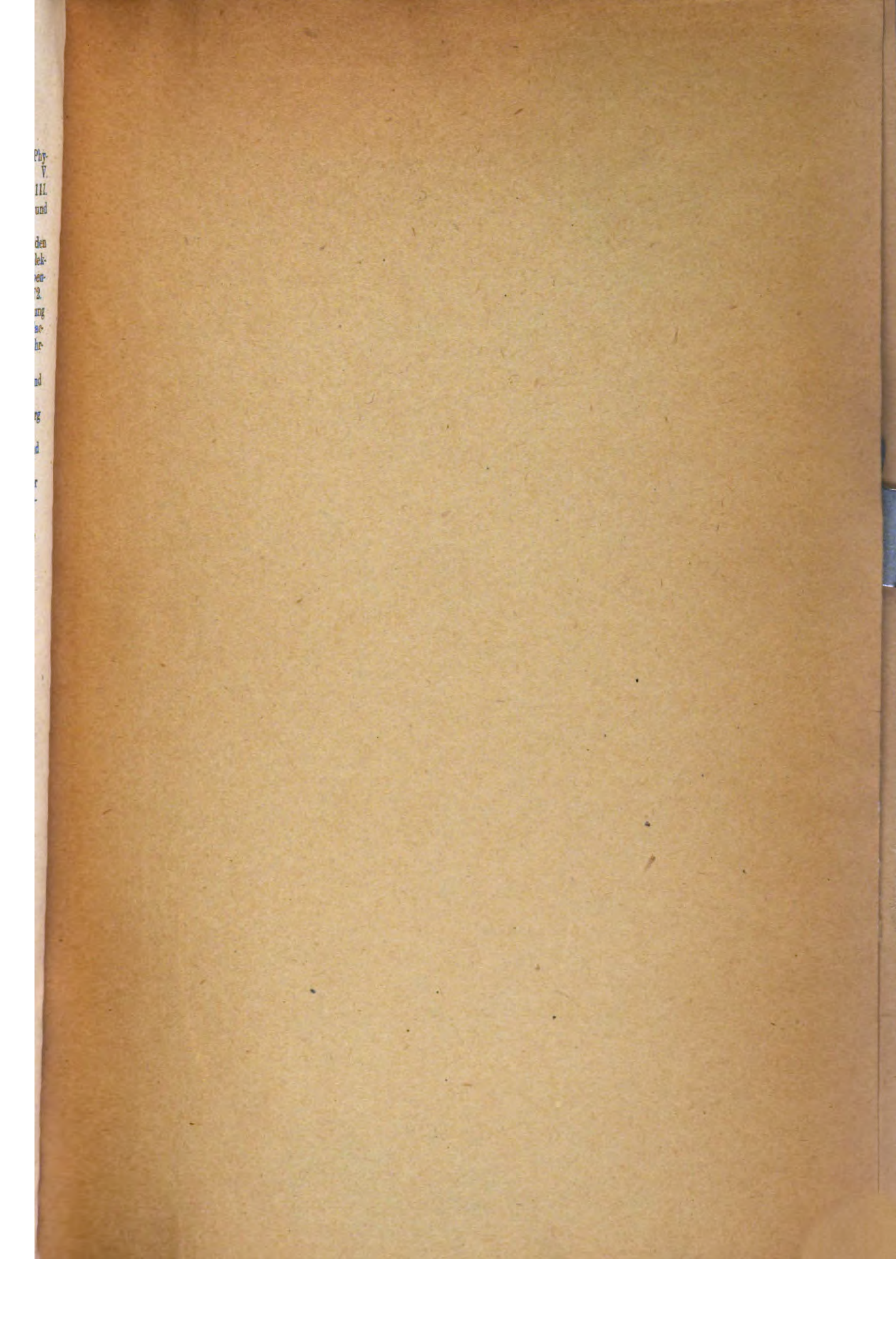
(Diese Zeitschr. 67, 166.)

Von

G. Doby.

In der 14. Zeile von oben muß es auf Seite 169 statt „durch ihre eigenen Spaltungsprodukte" heißen „durch die Spaltungsprodukte der Amylose".

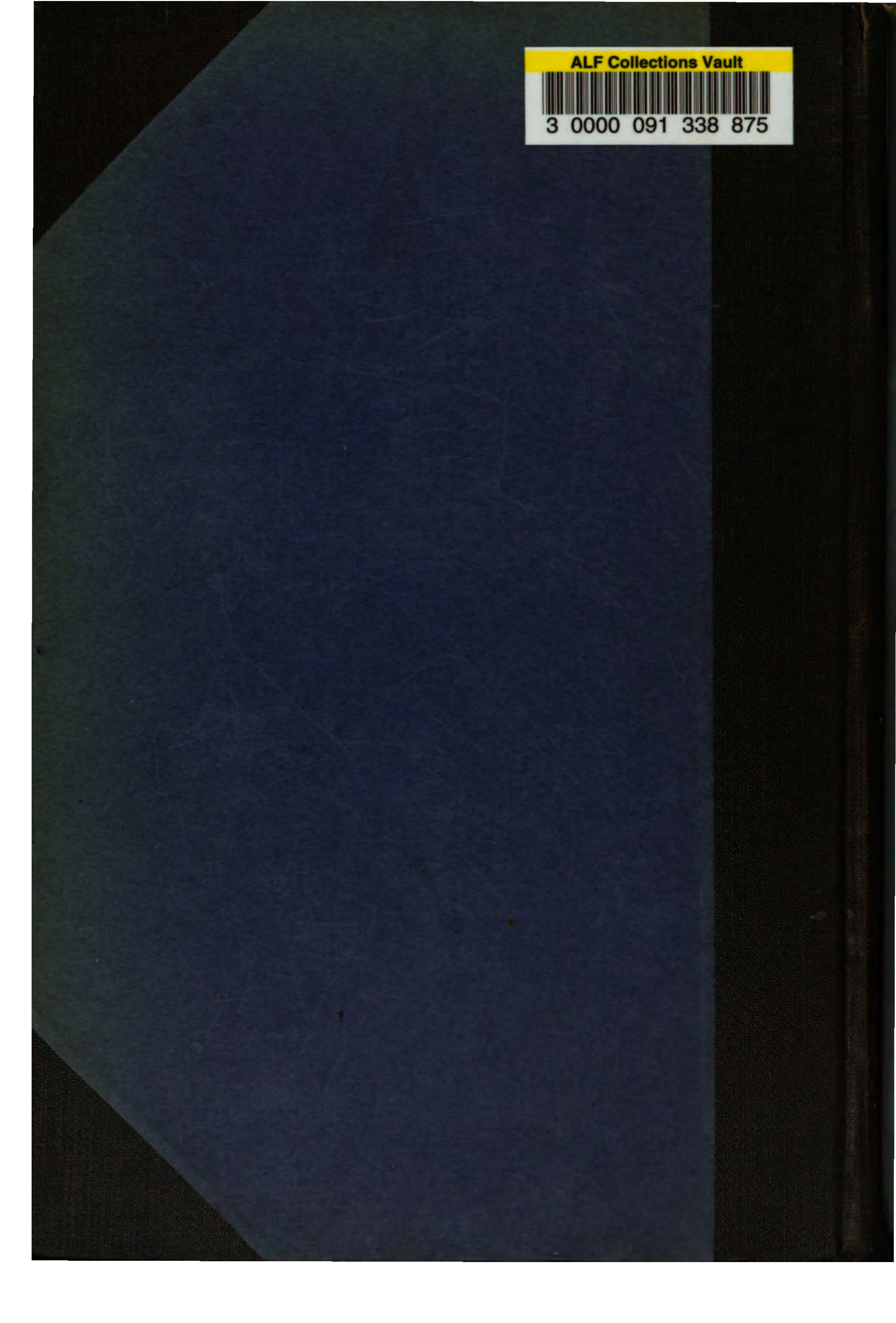
Autorenverzeichnis.






3 2000 013 063 518




ALF Collections Vault
3 0000 091 338 875